Aus dem Institut für Toxikologie
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. F. K. Ohnesorge

NEUE ERKENNTNISSE ZUR BIOCHEMISCHEN BASIS DER FUNKTIONELLEN MULTIPLIZITÄT DES FREMDSTOFF-METABOLISIERENDEN SYSTEMS ("CYTOCHROM P-450") IN KANINCHENLEBER

Habilitationsschrift
zur Erlangung der venia legendi
an der Universität Düsseldorf
für das Fach Biochemische Toxikologie

vorgelegt von
Dipl.-Biochem., Dr. rer. nat.
HERMANN H. DIETER

Düsseldorf 1985

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0108

Aus dem Institut für Toxikologie
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. F.K. Ohnesorge

NEUE ERKENNTNISSE ZUR BIOCHEMISCHEN BASIS DER FUNKTIONELLEN MULTIPLIZITÄT DES FREMDSTOFF - METABOLISIERENDEN SYSTEMS ("CYTOCHROM P-450") IN KANINCHENLEBER.

Habilitationsschrift
zur Erlangung der venia legendi an der
Universität Düsseldorf
für das Fach Biochemische Toxikologie

vorgelegt von
Dipl.-Biochem., Dr.rer.nat. Hermann H.Dieter

Düsseldorf 1985

INHALTSVERZEICHNIS

I-III

Abkürzungen und wichtige Begriffe IV,V;VI,VII

I. EINLEITUNG

1. Geschichtliche Anmerkungen zur Entdeckung des "Cytochrom P-450" 1
2. Multiplizität des "Cytochrom P-450" 2
3. Substratbindung und katalysierte Reaktionen 4
4. Zur Bedeutung der Multiplizität des "Cytochrom P-450" aus der Sicht der Biochemischen Toxikologie 6
5. Befunde zum genetischen Polymorphismus des "Cytochrom P-450" 9
6. Befunde zur strukturellen Multiplizität des "Cytochrom P-450" 11
7. Einleitende Untersuchungen und Fragestellung 17

II. METHODEN und MATERIAL

A. Methoden

1. Konzentrationsbestimmungen 22
2. Aktivitätsbestimmungen 22
3. Trennmethoden (TLC in II.A.2.) 25
4. Struktur- und Einheitlichkeitsnachweis für 6β-,16α- und 21-Hydroxyprogesteron (DOC) 26
5. Synthese von 16α-[α-^{3}H]-Bromacetylprogesteron 26
6. Stabilität von 16α-[α-^{3}H]-Bromacetylprogesteron unter Testbedingungen 28
7. Inkubationen von P-450 - Isoform 3b mit 16α-[α-^{3}H]-Bromacetylprogesteron 28
8. Bestimmung von Q(P ⟶ DOC) in Kaninchen 30

B. Material

1. Tiere 31
2. Mikrosomen und elektrophoretisch einheitliche P-450 - Isoformen 31
3. Sonstige Enzyme und Proteine 33
4. Substrate und Effektoren (ohne Radiochemikalien) 34
5. Radiochemikalien 35
6. Chromatographie- und Elektrophoresematerial 36
7. Fein- und Biochemikalien 37
8. Sonstige Chemikalien 37

III. ERGEBNISSE

A. Untersuchungen mit Mikrosomen 38

1. Schwankungsbreite und Korrelationen zwischen den Hydroxylierungen von Progesteron und Östradiol 38

2. Enzymkinetische Beschreibung der mikrosomalen Progesteron-Hydroxylierungen 43

2.1. 21-Hydroxylierung von Progesteron 43

2.2. 6β- und 16α-Hydroxylierung von Progesteron 45

1. 6β-Hydroxylierung 45
2. 16α-Hydroxylierung 49

3. Verteilung hoher und niedriger Aktivitäten unter NZW-Mikrosomen 51

3.1. 6β- und 16α-Hydroxylierung von Progesteron 51

3.2. 21-Hydroxylierung von Progesteron und 2-Hydroxylierung von Östradiol 53

B. In vivo - Untersuchung der Progesteron-21-Hydroxylierung 53

C. Substratspezifität elektrophoretischer P-450 - Isoformen 56

1. Qualitative Zuordnungen (Einpunktmessungen) 56

2. Charakterisierung von P-450 - Isoform 1 59

D. Vergleich der P-450 - Isoform "6β$^+$-Form 3b" mit der elektrophoretisch identischen "6β$^-$-Form 3b". 61

1. Reinigung und Elektrophorese der intakten Proteine 61

2. Funktioneller Vergleich 64

2.1. Metabolismus von Fremdstoffen im Rekonstituierten System (Einpunktmessungen) 64

2.2. Ausschluß enzymkinetischer Störfaktoren 64

2.3. Enzymkinetischer Vergleich der Progesteron-Hydroxylierung durch 6β$^+$- und 6β$^-$-Form 3b 66

1. 6β-Hydroxylierung 66
2. 16α-Hydroxylierung 68

2.4. Differentielle Hemmung dieser beiden Progesteron-Hydroxylierungen durch den Effektor 16α-Methylprogesteron 72

2.5. Variation der Vmax-Werte zwischen verschiedenen 6β$^+$-Formen 77

2.6. Differentielle Inhibierung und allosterische Aktivierung beider Form 3b-Varianten durch reduzierte Steroide 81

3. Ergebnisse chemischer Methoden 90

3.1. Affinitätsmarkierung von 6β$^-$-Form 3b 90

3.2. Vergleich proteolytisch erzeugter Peptidmuster von 6β$^+$- und 6β$^-$-Form 3b durch Elektrophorese und HPLC 95

IV. DISKUSSION

A. Hydroxylierung von Progesteron und Östradiol durch Form 1 101

B. Polyfunktionalität und Polymorphismus der elektrophoretischen P-450 - Isoform 3b 106

1. Die elektrophoretische Form 3b ist funktionell und strukturell polymorph 106
2. Allosterische Aktivierung beider Form 3b-Varianten durch reduzierte Steroide 108
3. Einfachster Strukturvorschlag für die elektrophoretische Form 3b; Vergleich mit Strukturhinweisen für andere P-450 - Isoformen aus Kaninchenleber 112
4. Vergleich mit Strukturhinweisen für P-450 - Isoformen aus Rattenleber 117
5. Genetischer Polymorphismus der elektrophoretischen Form 3b 118
6. Mögliche physiologische Bedeutung und Regulation beider Form 3b-Varianten 120
7. Versuch einer Bewertung aus biochemisch-toxikologischer Sicht 124

V. ZUSAMMENFASSUNG 126

VI. LITERATURANGABEN und ANMERKUNGEN 128

VII. DANKSAGUNG 139

VIII. ANHANG

1. Schreiben des Autors an P.Maurel,Montpellier,zur Frage der Identität von "TAO-Form 3b" 140
2. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis 143

Abkürzungen und wichtige Begriffe.

1. Abkürzungen

2-AAF	2-Acetylaminofluoren
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AFB_1	Aflatoxin B_1
AHH	Arylkohlenwasserstoff-Hydroxylase
AR	Autoradiographie
BNF	ß-Naphtoflavon
$[^3H]$-BrAcP	16α-[α-^3H]-Bromacetylprogesteron
BSA	Rinderserumalbumin
CM-	Carboxymethyl-
CO	Kohlenmonoxid
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
cpm	Zählereignisse pro Minute ("counts per minute")
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
"Diol"	5ß-Pregnan-3ß.20α-Diol
DMBA	Dimethylbenzanthrazen
DOC	11ß-Desoxycorticosteron ([^3H]-DOC:[1.2.6.7.16.17.-^3H]-DOC)
dpm	Zerfälle pro Minute ("decays per minute")
DTE	Dithioerythritol
d.Th.	der Theorie
EDTA	Äthylendiamino-Tetraessigsäure (Dinatriumsalz)
EPR	Endoplasmatisches Retikulum
GSH	Glutathion
Glyc.	Glycerin
HA-	Hydroxylapatit-
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
IF-11	Benennung des in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörpers gegen Form1 aus der Arbeitsgruppe von E.F.Johnson,La Jolla.
IR	Infrarot
KG	Kieselgel
K_i	Inhibitorkonstante (kompetitive Hemmung)
Km	Michaelis-Konstante (im Modell der enzymatischen Katalyse nach Michaelis-Menten)
KPi	0.05 M Kaliumphosphat-Puffer,pH 7.4; in Glycerin-haltigem KPi bezieht sich die Molarität auf das Endvolumen.
L	Liter

M	Mol/Liter ("molar")
MC	Methylcholanthren
mg	10^{-3} Gramm (Mengeneinheit für mikrosomales Protein)
MCA-A	Benennung des in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörpers gegen Form 3b aus der Arbeitsgruppe von E.F.Johnson, La Jolla,USA.
mM	mMol/Liter ("millimolar")
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure ("messenger-RNA")
mU	nMol/Minute (Internationale Einheit Enzym-katalysierter Umsetzungen).
µM	µMol/Liter ("mikromolar")
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenindinucleotid,reduziert (und Ribose-2'-phosphoryliert); Tetranatriumsalz.
nM	nMol/Liter ("nanomolar")
NZW-	New Zealand White (Rassebezeichnung für die in dieser Arbeit verwendeten random bred - Kaninchen).
OD	Optische Dichte (Extinktionseinheit)
P	Progesteron ([^{3}H]-P: [1.2.6.7.16.17.-^{3}H]-Progesteron)
PAGE	Polyacrylamid-Gelektrophorese
PB	Phenobarbital
PEG	Polyäthylenglykol
Q(P ⟶ DOC)	Quotient aus Progesteron-bürtigem DOC und Progesteron im Plasma (Fließgleichgewicht).
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAO	Triacetyloleandomycin
TCA	Trichloressigsäure
TCDD	2.3.7.8.-Tetrachlor-Dibenzo-p-Dioxin
TLC	Dünnschichtchromatographie
U	µMol/Minute (Internationale Einheit Enzym-katalysierter Umsetzungen)
UV	Ultraviolett
Vmax	Maximale Umsetzungsgeschwindigkeit (im Modell der enzymatischen Katalyse n. Michaelis-Menten).
V_t	Gesamtvolumen

2. Wichtige Begriffe.

"Cytochrom P-450": Sprachlich-operative Bezeichnung für den Häm-haltigen Anteil ("P-450 - Isoformen",s.u.) des intakten,Substrate der verschiedensten Art monooxygenierende Multienzymsystems des EPR bzw. dessen biochemischer Präparationsform,der Mikrosomen. Neben den in vivo nach Art und Anzahl von Fall zu Fall wechselnden P-450 - Isoformen enthält die funktionelle Einheit dieses Systems noch die NADPH/Cytochrom P-450 - Reduktase und einen variablen Lipidanteil. Das "Cytochrom P-450" kann bis zu 27% des mikrosomalen Proteinanteils stellen.

"Cytochrom P-448": s. "Cytochrom P-450"; Unterschied: Das Maximum der Lichtabsorption des reduzierten CO-Komplexes liegt nicht bei 450,sondern bei 448 nm. Im Text war es allerdings in den meisten Fällen nicht nötig,genau diese Wellenlänge zu benennen,so daß mit wenigen Ausnahmen der übergeordnete,weil historisch ältere Begriff "Cytochrom P-450" beibehalten wurde.

Multiplizität: Sprachlich-operative Bezeichnung für die große Variationsbreite der phänotypischen Ausprägung des "Cytochrom P-450" in struktureller und funktioneller Hinsicht. Diese beiden,sowie der genetische Teilaspekt der Multiplizität des "Cytochrom P-450" werden - wo nötig - im Text jeweils spezifiziert.

Polymorphismus: Dieser Begriff wird in der P-450 - Literatur oft als Synonym für "Multiplizität" verwendet. In dieser Arbeit wird er nur auf strukturell und/oder funktionell und/oder genetisch genau benennbare Einzelbeispiele der Multiplizität des "Cytochrom P-450" angewandt.

P-450 - Isoform: Häm-haltige,in der SDS-PAGE homogen erscheinende Untereinheit des "Cytochrom P-450" mit einem Molekulargewicht um 50000 d. Die prosthetische Häm-Gruppierung aller bekannten Isoformen ist Protoporphyrin IX. Im (Apo)proteinanteil unterscheiden sich die einzelnen Isoformen,soweit bekannt,geringfügig bis erheblich (Primärstruktur; in vivo eingefügte Fremdreste von Aminosäuren). Die P-450 - Isoformen weichen von der in der Literatur sonst üblichen Definition der Isoformen anderer Enzymgruppen zumindest insofern ab,als sie unterschiedliche Substrat- und Produktspezifitäten besitzen (vgl. jedoch DISKUSSION, Teil B.4.,letzter Absatz,S.118).

Form 1; Form 2; ...: Synonym für "P-450 - Isoform" immer dann,wenn von einzelnen,durch die Zuordnung von Zahlen und/oder Buchstaben genau bezeichneten Isoformen des "Cytochrom P-450" die Rede ist.

Subform: Mögliche Untereinheit einer elektrophoretisch einheitlich erscheinenden P-450 - Isoform.

Induzierbare Isoformen des "Cytochrom P-450: P-450 - Isoformen,die nach Behandlung von Versuchstieren mit bestimmten "Induktoren" (MC,PB,BNF,u.a.) dort,evtl. auch Organ-spezifisch,vermehrt vorkommen.

Konstitutive Isoformen des "Cytochrom P-450":	P-450 - Isoformen, für die im Sinne der vorgenannten Definition "induzierbarer" Isoformen (noch) kein Induktor bekannt geworden ist und deren Vorhandensein im lebenden Tier (ex vivo - Messungen) in physiologisch relevanten Mengen vermutet werden kann.
Rekonstituiertes System:	vgl. II.A.2 a), Seite 22 und EINLEITUNG, Seite 2 (2.Absatz).
NZW-Kaninchen:	Genetisch nicht definierte "random bred"-Kaninchen der Rasse NZW von Zuchtstationen aus der Umgebung von San Diego, USA, oder aus dem Tierhaus der Universität Düsseldorf.
IIIVO/J-Kaninchen:	Inzuchtform von Kaninchen der Rasse NZW mit einem Inzuchtkoeffizienten von 0.98 (158). Die Tiere sind bezüglich des Genotyps für Form 3b vermutlich homozygot.
NZW-Form 3b:	Synonym für $6\beta^+$-Form 3b (Verwendung nur auf S.57 in Zusammenhang mit der Erläuterung von Tabelle 5).
IIIVO/J-Form 3b:	Synonym für $6\beta^-$-Form 3b (Verwendung nur auf S.57 in Zusammenhang mit der Erläuterung von Tabelle 5).
$6\beta^+$-Form 3b:	Definition S.57
$6\beta^-$-Form 3b:	Definition S.57
$6\beta^+$-Mikrosomen:	Definition S.49
$6\beta^-$-Mikrosomen:	Definition S.49
21h-Mikrosomen:	Definition S.45
21n-Mikrosomen:	Definition S.45
21h-Form 1:	Aus 21h-Mikrosomen isolierte Form 1.
21n-Form 1:	Aus 21n-Mikrosomen isolierte Form 1.

I. EINLEITUNG.

1. Geschichtliche Anmerkungen zur Entdeckung des "Cytochrom P-450".

Das mikrosomale "Cytochrom P-450" stellt den wahrscheinlich vielseitigsten der heute bekannten und in biologischem Material anzutreffenden Katalysatoren dar. Seine Auffindung in Lebermikrosomen (= biochemische Präparationsform des Endoplasmatischen Retikulums) gelang erstmals 1957/58 anhand der starken Absorption seines reduzierten Kohlenmonoxid-Komplexes bei 450 nm (1 - 3),einer für die Absorption eines Häm-Chromophors damals völlig unerwarteten Wellenlänge. Omura und Sato fanden später (4),daß es sich um ein Cytochrom vom sog. "b-Typ" handeln mußte,das sich unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von NADH oder NADPH leicht reduzieren ließ,bei Sauerstoffzutritt aber leicht wieder oxidierte. Die endgültige Identifizierung der prosthetische Gruppe als Eisen-Protoporphyrin IX gelang erst 1973 (5).

Die leichte Oxidierbarkeit des "Cytochrom P-450" durch molekularen Sauerstoff (besonders niedriges Redox-Potential) gab Anlaß zu der Vermutung,es handle sich um ein archetypisches Enzym(system). Seine ursprüngliche Aufgabe könnte darin bestanden haben,in der reduzierenden Uratmosphäre lebende Strukturen vor dem chemischen Angriff durch Sauerstoff dadurch zu schützen,daß es diesen rechtzeitig zu Wasser reduzierte (6).

Wasser ist nach wie vor das mengenmäßig wichtigste Endprodukt der meisten durch das "Cytochrom P-450" katalysierten Reaktionen. Seine eigentliche katalytische Funktion dürfte jedoch heute darin bestehen,Substrate verschiedenster Art und Herkunft durch Umwandlung einer Wasserstoff- in eine Hydroxylfunktion (Einfügung eines Sauerstoffatoms) zu oxidieren. Erste Hinweise hierauf erhielt man 1963-1965. Damals zeigten Estabrook et al. (7 - 9),daß sich die mikrosomale Hydroxylierung verschiedener Substrate durch Kohlenmonoxid hemmen ließ. Die Aufhebung dieser Hemmung gelang durch Bestrahlen mit Licht. Die optimale Wellenlänge hierfür war λ = 450 nm,derselbe Wert also,der auch bereits als Maximum der Lichtabsorption des b-Cytochroms (reduzierter CO-Komplex) von Omura und Sato (4) bekannt war.

Die sich daran anschließende genauere Untersuchung der enzymatischen Eigenschaften des "Cytochrom P-450" stieß auf erhebliche experimentelle Schwierigkeiten. Wie bei allen Membran-gebundenen Enzymsystemen war es nicht einfach,es aus seiner natürlichen Membranumgebung,dem Endoplasmatischen Retikulum (EPR) bzw. dessen biochemischer Präparationsform,den Mikrosomen,herauszulösen. Es wandelte sich dabei

leicht in eine Form um,deren reduzierter CO-Komplex bei 420 statt bei 450 nm maximal absorbierte (10). Parallel dazu verlor es auch seine katalytische Aktivität.

Die raschesten Fortschritte konnten bei der Präparation von "Cytochrom P-450" aus Kaninchenleber erzielt werden (11, 12). Nach Desintegration der Mikrosomen-Vesikel durch Behandlung mit bestimmten ionischen, später auch nichtionischen Detergentien ließ es sich durch Ionenaustausch-Chromatographie in drei Subkomponenten auftrennen. Es handelte sich dabei um das "Cytochrom P-450" selbst, außerdem um ein Enzym mit der Fähigkeit, dieses "Cytochrom P-450" in Gegenwart von NADPH zu reduzieren (Cytochrom P-450 - Reduktase), sowie eine hitzestabile Fraktion, deren Hauptbestandteil Phosphatidylcholin war (13).

Keine der drei Subkomponenten besaß für sich die Fähigkeit, irgendeine der in Gegenwart intakter Mikrosomen beobachteten Reaktionen zu katalysieren. Nach ihrer erneuten Zusammensetzung (Rekonstitution) in bestimmten Mengenverhältnissen wurde jedoch die bemerkenswert breite Substratspezifität der mikrosomalen, "Cytochrom P-450" - abhängigen Hydroxylierungsreaktionen zurückerhalten.

Die Möglichkeit der Desintegration und erneuten Zusammensetzung des Systems aus seinen Subkomponenten ließ sich außer für Kaninchen (14) bald auch für die Ratte (15), die Maus (16) und andere Versuchstiere, sowie für Mikrosomen aus Humanleber (17) belegen.

Als Substrate des mikrosomalen "Cytochrom P-450" kennt man heute eine Reihe physiologisch vorkommender Verbindungen wie Lipide, Steroide oder Prostaglandine, aber auch eine Vielzahl synthetischer Verbindungen, zu welchen z.B. Arzneimittel, Ölprodukte, Pestizide oder Umweltkontaminantien der verschiedensten Art zu rechnen sind.

2. Multiplizität des "Cytochrom P-450".

Die Vermutung, Lebermikrosomen verschiedener Spezies unterschieden sich u.a. durch die Verschiedenheit ihrer Enzyme bei der Katalyse des Metabolismus von Arzneimitteln und Fremdstoffen, wurde erstmals von Axelrod (18) ausgesprochen.

In einer früheren Arbeit von Conney et al. (19) findet sich bereits die weitergehende Hypothese,daß selbst die Leber einer einzigen Spezies mehrere Fremdstoff-metabolisierende Enzyme enthalte. Zur Begründung wurde u.a. die differentielle Induzierbarkeit dieser Aktivitäten angeführt: Nach Verabreichung von Benz(a)pyren an Ratten kam es zwar zur erhöhten Verstoffwechselung von Benzo(a)pyren, Acetanilid,Zoxazolamin und 3.4.-Dimethylaminoazobenzol, doch war gleichzeitig der Stoffwechsel von Chlorpromazin überhaupt nicht beeinflußt, und derjenige von Meperidin und Benadryl sogar stark verlangsamt.

Nach der im vorigen Abschnitt kurz skizzierten Identifizierung des "Cytochrom P-450" als Fremdstoff - metabolisierendes Prinzip richtete sich das Augenmerk jetzt auf die Formulierung von Hypothesen zur Erklärung der differentiellen Beeinflußbarkeit der einzelnen Aktivitäten. Als biochemische Grundlage für diese Beobachtung vermutete man von Anfang an das Vorhandensein struktureller Untereinheiten in der "Cytochrom P-450"-haltigen Subkomponente des Gesamtsystems aus Cytochrom, Reduktase und hitzestabilem Lipidanteil. Man nennt sie heute P-450 - Isoformen (vgl. "wichtige Begriffe",Seite VI).

Doch auch die Existenz eines einzigen P-450 - Cytochroms wurde anfangs (67) erwogen. Diese Möglichkeit implizierte jedoch die komplizierende Zusatzannahme,die Aktivierung/Inhibierung des "Cytochrom P-450" folge je nach angebotenem endogenem oder exogenem Substrat oder Regulator einem anderen Spezifitätsmuster.

Eine nach wie vor begründete Hypothese stellt zwischen der beispiellosen Substrat- und Produktvielfalt einerseits,sowie definierten Veränderungen der Lipidzusammensetzung der unmittelbaren Membranumgebung des "Cytochrom P-450" in künstlichen Lipidvesikeln andererseits,einen plausiblen Zusammenhang her (20,20a). In vivo könnte das Lipidmuster der EPR-Membran und ihr "Cytochrom P-450"-Gehalt genetisch festgelegt sein. Davon dürfte in Einzelfällen die Ortsveränderlichkeit des "Cytochrom/Reduktase"-Komplexes (vgl. Abb. 1) in der Membran abhängen sowie seine Fähigkeit,seine Substrat- und Produktspezifität durch Änderung seiner unmittelbaren Lipidumgebung zu beeinflussen (20b).

Die seitherige Isolierung und Reindarstellung zahlreicher Reduktase- und Lipid-freier P-450 - Isoformen aus ein und demselben Organ(ismus) hat die Argumentation jedoch stark zugunsten der Anwesenheit einer bisher unbekannten Anzahl von P-450 - Isoformen verschoben. Es vergeht zur Zeit kaum ein Monat, ohne daß nicht in irgendeiner Fachzeitschrift Isolierung und Charakterisierung neuer Cytochrom P-450 - Isoformen aus den verschiedensten Tierorganen, Pflanzen oder Einzellern beschrieben würde.

Einen Oberblick über die bis Ende 1979 bekannten Cytochrom P-450 - Isoformen aus Säugetieren geben Lu und West (21).

Die weitestgehenden Vorstellungen von der Multiplizität des "Cytochrom P-450" vertritt Nebert (22, 23). Er schlägt vor, von der Existenz tausender verschiedener P-450 - Isoformen auszugehen. Sie sollen sich nach Art der strukturellen

Organisation von gegen dasselbe Antigen gerichteten Antikörpern strukturell nur sehr wenig, jedoch signifikant voneinander unterscheiden, und nach dem Baukastenprinzip aus sehr ähnlichen Grundeinheiten zusammengesetzt sein.

Die entgegengesetzte Ansicht stellt Burke zur Diskussion, wenn er die Frage stellt, ob es sich bei den bisher für die Multiplizität sprechenden Kriterien vielleicht nur um biochemische Merkwürdigkeiten, Artefakte also, handle, nicht aberum ernstzunehmende Grundbedingungen des normalen Arzneimittel- und Fremdstoffwechsels im Säuger (24).

3. Substratbindung und katalysierte Reaktionen

Nach heutigem Kenntnisstand ist "Cytochrom P-450" die gemeinsame Bezeichnung für eine Vielzahl Häm-haltiger Proteine verschiedener Zellorganellen (EPR, Mitochondrien, Kern). Sie bilden im reduziertem Zustand mit Kohlenmonoxid, CO, einen Komplex, der bei 450 nm ein Maximum der Lichtabsorption besitzt ("Soret-Bande").

Diese P-450 - Isoformen können in Mikrosomen bis zu 27% des Proteingehaltes stellen und sind als solche Hauptbestandteil des mikrosomalen Elektronentransportsystems der Leber. Dieses System enthält neben "Cytochrom P-450" noch die beiden Flavoproteine NADPH-Cytochrom P-450 - Reduktase (E.C. 1.6.2.4.) und die NADH-Cytochrom b_5 - Reduktase (E.C. 1.6.2.2.), sowie das Hämoprotein b_5.

Abbildung 1 zeigt die räumliche Anordnung dieser Komponenten gemäß einem Membranmodell aus (25). Das zentral angeordnete Reduktase-Molekül wird von einer unbekannten Anzahl von P-450 - Isoformen umgeben, die sich im Proteinanteil voneinander unterscheiden. Zusammen mit dem(n) umgebenden Lipid(en) entsteht auf diese Weise eine funktionelle Einheit mit der Fähigkeit, zahlreiche verschiedene Substrate zu binden und umzusetzen.

Bezüglich der Art ihrer Bindung an das Enzym unterscheidet man drei Typen von Liganden (Abb. 2). Die besten Substrate sind lipophil (R-H) und binden an die "high-spin" - Form des Cytochroms, wogegen die Bindung hydrophiler Verbindungen (R-OH oder $R-NH_2$) nur an die "low spin" - Form erfolgt (26).

Die Reduktion ($Fe^{+++} \longrightarrow Fe^{++}$) des Cytochrom Substrat-Komplexes erfolgt nur in der "high-spin" - Form. Das Gleichgewicht zwischen "low"- und "high-spin" - Form stellt sich aber, je nach Art des Fe^{+++} -koordinierten

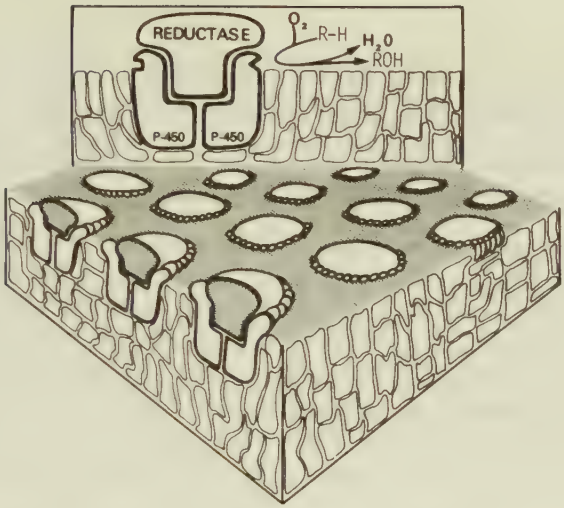


ABBILDUNG 1: Vorschlag zur räumlichen Einbettung einzelner P-450 - Isoformen und der Cytochrom P-450 - Reduktase in lipophile Bereiche des Endoplasmatischen Membransystems (aus (25), leicht modifiziert).

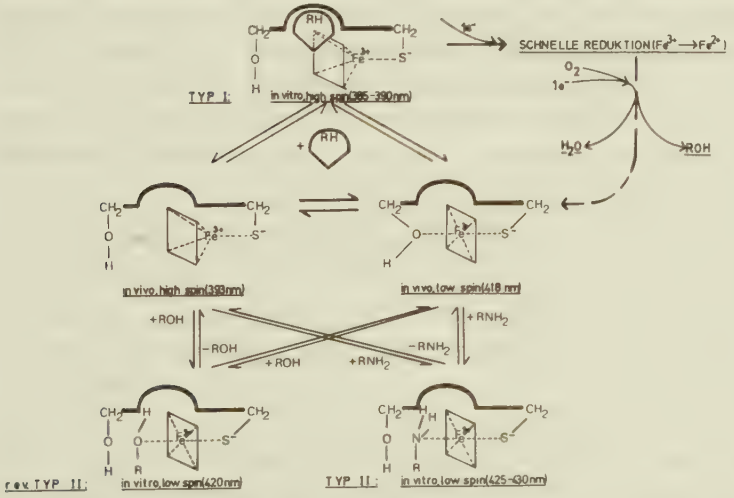


ABBILDUNG 2: Vorschlag zur Darstellung der Substratbindung an das Bindungszentrum einer P-450 - Isoform in Abhängigkeit vom spin-Zustand (in Anlehnung an (26); stark erweitert). Vgl. Text S.4/6.

Liganden, sehr langsam ein. Manche dieser Stoffe (R-OH oder $R-NH_2$) sind deshalb wirksame Inhibitoren mikrosomaler Hydroxylierungen (27,28).

Die Absorptionsmaxima der einzelnen Komplex-Arten sind in Abbildung 2 mitaufgeführt und bedürfen hier keiner näheren Beschreibung.

Das mikrosomale (endoplasmatische) Elektronentransporsystem heißt auch mischfunktionelle Monoxygenase, weil es von molekularem Sauerstoff nur ein Atom in das jeweilige Substrat einführt, das andere degegen entsprechend seiner vermuteten ursprünglichen Funktion (s.S. 1) zu Wasser reduziert. Man könnte allerdings auch sagen, daß ein Sauerstoff-Atom durch Substrat, das zweite durch Wasserstoff aus NADPH reduziert wird:

$$R-H + NAD(P)H + H^+ + O_2 \longrightarrow R-OH + NAD(P)^+ + HOH$$

Unabhängig von der An- oder Abwesenheit des Substrates verhält sich das System nach folgender Gleichung aber auch wie eine NAD(P)H-Oxidase:

$$NAD(P)H + H^+ + O_2 \longrightarrow NAD(P)^+ + H_2O_2$$

An Stelle von R-OH und H_2O entsteht dabei das Zellgift Wasserstoffperoxid, das in vivo in einer nachgeschalteten Reaktion von Katalase entfernt wird.

Eine weiter vereinfachte Reaktionsfolge ergibt sich, wenn man den molekularen Sauerstoff durch eine Peroxy-Verbindung (XOOH) ersetzt; der Multienzymkomplex kann dann auch als Peroxygenase betrachtet werden (29):

$$XOOH + R-H \longrightarrow X-OH + R-OH$$

Dabei handelt es sich formal um eine Disproportionierungsreaktion, zu deren Ablauf weder molekularer Sauerstoff, noch NAD(P)H benötigt werden. Mechanismus und Abfolge der einzelnen Reaktionsschritte sind in (29) eingehend dargestellt.

4. Zur Bedeutung der Multiplizität des "Cytochrom P-450" aus der Sicht der Biochemischen Toxikologie.

Von den dargestellten drei Reaktionsfolgen ist für den biochemischen Toxikologen vor allem die erste von Interesse. R-H steht dann für lipidlösliche (weitgehend wasserunlösliche) körperfremde Substrate oder Xenobiotica. Sie werden durch Überführung in eine Hydroxylverbindung (R-OH) mehr oder weniger wasserlöslich oder polar gemacht ("Phase I-Metabolismus"). Danach können sie den Körper entweder direkt oder nach Ankopplung (Konjugation) an einen körpereigenen "Schlepper" wie Glutathion oder Glucuronsäure ("Phase II-Metabolismus") wesentlich schneller verlassen als in wasserunlöslichem Zustand.

Der biologische Sinn dieser Umsetzungen wird heute im allgemeinen darin ge-

sehen, daß durch sie der Stoffwechsel vor möglicherweise schädigenden Einflüssen exogen zugeführter Substanzen der verschiedensten,vom Organismus nicht "vorhersehbaren" Strukturen geschützt wird (Entgiftung,Inaktivierung).

Es gibt jedoch Beispiele dafür, daß aus Xenobiotica, die an sich nicht toxisch sind, durch diese Transformationsreaktionen toxische Metabolite entstehen (Giftung, Aktivierung). Als Beleg für Aktivierung und Inaktivierung ein- und desselben Stoffes sei der Stoffwechsel des 2-Acetylaminofluorens angeführt (30), das je nach vorherrschender Substratspezifität des mikrosomalen "Cytochrom P-450" in Kaninchenleber entweder aktiviert (N-hydroxyliert) oder inaktiviert (C-7 - hydroxyliert) wird. Im ersten Fall ist die entstehende Verbindung ein potentes chemisches Karzinogen, im zweiten dagegen ein harmloses Ausscheidungsprodukt.

Solche Beobachtungen sind als Hinweis darauf zu verstehen, daß das endoplasmatische (mikrosomale) "Cytochrom P-450" - System Aufgaben hat, die dem Fremdstoffmetabolismus vorgeordnet sind, z.B. beim Metabolismus körpereigener fettlöslicher Stoffe (Lipide, Steroidhormone, Prostaglandine oder Fettsäuren). Die Regulation dieser Aufgaben wiederum ist Funktionsziel übergeordneter (Steroid)hormone,wie Colby (31) ausführlich dargestellt hat. Aus dieser Sicht hängt das toxische Potential eines Fremdstoffes für ein(e) bestimmte(s) Organ (Spezies) u.U. entscheidend davon ab, auf welche vorgeordneten Stoffwechselfunktionen die im Einzelfall zu betrachtenden P-450 - Isoformen festgelegt sind. Eine solche Festlegung kann eine genetische (s. Abschnitt I.5), aber auch eine rein strukturelle Basis besitzen (s. Abschnitt I.6).

Damit wird eine weitere Variable des Toxizitätspotentials eines Fremdstoffes erkennbar: Die Störung nämlich von,im Vergleich zum Fremdstoffmetabolismus, evolutionsgeschichtlich wohl meist älteren Stoffwechselwegen mit eindeutigem, wenn auch dem Menschen (noch) nicht immer bekanntem endogenem Sinn, durch Xenobiotica auf der Ebene der phänotypischen Expression des mikrosomalen "Cytochrom P-450".

Die wenig ausgeprägte Substrat- und Produktspezifität der "Cytochrom P-450"-Enzymfamilie gegenüber den meisten Xenobiotica deutet ebenfalls darauf hin, daß in der spezifischen Umsetzung endogener Substrate die übergeordnete metabolische Bedeutung der mikrosomalen P-450 - Cytochrome liegt. Dem entspricht die in der Enzymologie bis heute wohl einmalige Tatsache, daß für bisher in

hochgereinigter Form vorliegende "Cytochrom P-450" - abhängige Aktivitäten die enzymatische Beschreibung spezifischer Enzym/Substrat - Wechselwirkungen erst für wenige Xenobiotica gelungen ist. Dies könnte daran liegen, daß solche spezifischen Wechselwirkungen zwischen Xenobiotica und beliebig hochgereinigten Isoformen des mikrosomalen Cytochroms tatsächlich die Ausnahme sind. Denkbar wäre aber auch, daß die meisten der bis jetzt hochgereinigt vorliegenden Aktivitäten im Sinne von Nerbert (22, 23) im Apoprotein nach wie vor heterogen sind und nur von endogenen Regulatoren oder Substraten funktionsspezifisch erkannt werden können.

Ein wesentlicher Ansatz zur Abschätzung des toxischen Potentials eines Fremdstoffes besteht folgerichtig darin, die Frage nach Ausmaß und Regulation der Multiplizität der einzelnen Komponenten des Multienzymsystems "Mischfunktionelle Monooxygenase" möglichst weitgehend zu klären. Dabei wird man zweckmäßigerweise zwischen zwei Untersuchungsebenen unterscheiden: Einmal die Ebene der strukturellen Multiplizität, also der Regulation und phänotypischen Expression von im betreffenden Organ(ismus) nachgewiesenen und deshalb mit Sicherheit auch genetisch codierten P-450 - Isoformen, und zum anderen die Ebene der biologisch vorgegebenen genetischen Multiplizität, auf der danach zu fragen ist, welche Isoformen in dem untersuchten Organismus genetisch vorhanden sind und welche nicht. Um die Verwechslung beider Multiplizitätsvorstellungen auszuschließen, wird die genetische Multiplizität im folgenden als "genetischer Polymorphismus" bezeichnet.

Auf der Ebene der strukturellen Multiplizität geht es um Unterschiede zwischen Organen und P-450 - Isoformen ein- und derselben Art, besser ein- und desselben Inzuchtstammes oder Einzelindividuums. Auf der genetischen Ebene dagegen stehen Unterschiede in der genetischen Ausstattung zweier verschiedener Arten, besser zweier Inzuchtstämme oder Einzelindividuen derselben Art im Mittelpunkt des Interesses.

Die Ergebnisse beider Untersuchungsebenen sind nicht zuverlässiger als die Methoden, mit deren Hilfe sie gewonnen wurden. Zur Untersuchung der Multiplizität eines Isoprotein-Komplexes, wie er im "Cytochrom P-450" zweifellos vorliegt, stehen heute eine Reihe hochauflösender Methoden der physikalischen Trennung und Differenzierung zur Verfügung. Vorläufig oder endgültig gereinigte Isoformen können mit Hilfe kovalent bindender Affinitätsproben auf ihre funktionelle Homo- oder Heterogenität geprüft werden. Im Fall der Auffindung eines sehr spezifisch umgesetzten Substrates könnten aber nach wie vor auch "konventionelle" Methoden der Enzymkinetik wertvolle Dienste leisten.

Die mit solchen Methoden zur Aufklärung der strukturellen Multiplizität und des genetischen Polymorphismus des "Cytochrom P-450" bis Ende 1982 erzielten Erfolge veranschaulichen die beiden folgenden Abschnitte.

5. Befunde zum genetischen Polymorphismus des "Cytochrom P-450".

Die Reindarstellung und Aufschlüsselung (Kartierung) der strukturellen Information von Säuger-Genomen steht, im Gegensatz zur Strukturaufklärung der Genprodukte, experimentell erst am Anfang. Erfolge bei der Untersuchung des genetischen Polymorphismus sind deshalb auch im Fall des "Cytochrom P-450" noch auf biologische Methoden zur Darstellung vergleichbarer Genome angewiesen.

Beim Menschen greift man zu diesem Zwecke hauptsächlich auf Zwillings- und Familienstudien zurück. Solche Untersuchungen haben trotz zahlreicher umweltbedingter Störmöglichkeiten gezeigt, daß der Stoffwechsel vieler Arzneimittel eine Funktion der genetischen Disposition des betreffenden Individuums, also auch der genetisch festgelegten funktionellen Multiplizität seines mikrosomalen "Cytochrom P-450" ist (32). Die funktionelle Multiplizität des "Cytochrom P-450" aber ist der phänotypische Ausdruck seiner strukturellen Multiplizität.

Ein besonders bekanntes Beispiel für einen erblich festgelegten mikrosomalen "Cytochrom P-450"- Defekt ist die Congenitale Adrenale Hyperplasie (33,34). Bei dieser Krankheit fehlt der Nebennierenrinde diejenige mikrosomale P-450 - Isoform, die Progesteron in 21-Stellung hydroxyliert. Es wird deshalb nicht weiter in Richtung Glucocorticoide, sondern via 17α-Hydroxyprogesteron vermehrt in Androstendion und Testosteron umgewandelt (35).

Ein anderer Beweis für den genetischen Polymorphismus des "Cytochrom P-450" beim Menschen ist die vom Genstatus abhängige 4-Hydroxylierung von Debrisoquin (36, 37). Hier dürfte es sich um eine mikrosomale P-450 - Isoform der Leber handeln, die innerhalb der menschlichen Population bimodal verteilt ist. Es bestehen interindividuell bis zu 20.000-fache Aktivitätsunterschiede.

Bi- oder höhermodale Verteilungen sind nicht zu erwarten, wenn die interessierende Stoffwechselfunktion von mehreren Genen, also polygenisch gesteuert wird (37). Die Expression der einzelnen Gene kann dann nur untersucht werden, wenn zuvor eine funktionsgeleitete biologische Gen-Seggregation vorgenommen wird. Dies ist bei Versuchstieren durch Heranziehung von Inzuchtstämmen möglich. Hierfür gibt es eine Reihe von Beispielen mit mikrosomalen und nicht-mikrosomalen Enzymen. Bereits 1972 (38) wurde beschrieben, daß sich die mikrosomale 7α-Hydroxylase nur in einem von 2 untersuchten Rattenstämmen durch PB induzieren

läßt. Auch für die 18- und 11ß-Hydroxylierung von Steroiden gibt es Hinweise auf einen genetischen Polymorphismus in Ratten (39).

Die umfangreichsten, in funktioneller Hinsicht aussagekräftigsten tierexperimentellen Untersuchungen zum genetischen Polymorphismus des "Cytochrom P-450" stammen von Nebert et al.. In seiner Arbeitsgruppe wurden durch wiederholte Rückkreuzungen zwei Mäusestämme gezüchtet, die sich vor allem durch die Reaktion auf bestimmte Induktoren des "Cytochrom P-450", im engeren Sinne des "Cytochrom P-448", unterscheiden.

Der Stamm C57BL/6N besitzt einen cytosolischen Rezeptor, der TCDD mit einer K_d von ca. 0.7 nM bindet. Der Stamm DBA/2 besitzt diesen Rezeptor entweder nicht oder nur mit stark verminderter Affinität für TCDD. Das Strukturgen für diesen Rezeptor ist das wichtigste Einzelgen eines Clusters von Genen ("Ah-cluster"), die für mindestens 20 verschiedene P-450 - Isoformen codieren. Diese lassen sich zwar im Stamm C57BL/6N, nicht aber im Stamm DBA/2 durch geringe TCDD - Gaben phänotypisch zur Expression bringen (40). Auch Alters- und Gewebs-spezifische Unterschiede der Induzierbarkeit dieser Aktivitäten konnten nachgewiesen werden.

Viele Befunde an diesen Mäusestämmen sprechen dafür, daß unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber chemischer Karzinogenese, Toxizität von Fremdstoffen, und Wirkungen potentiell teratogener Stoffe auf Unterschiede der Induzierbarkeit des Ah-clusters zurückgeführt werden können (41,42).

Ein anderer genetischer Polymorphismus an Maus-Inzuchtstämmen bezieht sich auf die 7-Hydroxylierung von Cumarin und ist im sog. "Coh-cluster" lokalisiert. Die Existenz dieses clusters wurde erstmals von Wood et al. (43-45) postuliert. DBA/2-Mäuse, nach den von Nebert entwickelten Kriterien "nicht-responsiv", besitzen eine ca. 4-mal höhere Cumarin-7-hydroxylierende Basalaktivität als die "Ah-responsiven" C57BL/6N - Mäuse. Nur PB, nicht aber MC induziert diese Aktivität. Man hat diese Beobachtungen mit der verminderten Toxizität von Cumarin und des strukturverwandten Warfarin für DBA/2 - Mäuse in Zusammenhang gebracht.

Auch bei Kaninchen besteht bezüglich der 7-Hydroxylierung dieses Substrates durch das mikrosomale "Cytochrom P-450" ein genetischer Polymorphismus (46). Je nach Rasse wird eine Aktivität von 0.05 bis 0.54 mU/mg gefunden. Die Aktivität läßt sich jedoch, im Gegensatz zu den Befunden an DBA/2-Mäusen, nicht durch PB, allerdings auch nicht durch MC induzieren und nimmt mit zunehmendem

Alter der Tiere ab. Angesichts der zahlreichen, inzwischen aus Kaninchenleber isolierten und enzymkinetisch auch weitgehend charakterisierten P-450 - Isoformen (s. nächster Abschnitt) ist für den biochemischen Toxikologen die Frage von Interesse, ob die Expression der korrespierenden P-450 - Isoform(en) stammabhängig auf der Ebene der strukturellen Multiplizität oder des genetischen Polymorphismus gesteuert wird.

Untersuchungen der in diesem Abschnitt genannten Art sind unabdingbar zur Aufklärung der molekularen und genetischen Regulationsmechanismen, die für die breiten Streuungen der Empfindlichkeit gegenüber toxischen Wirkungen von Fremdstoffen innerhalb ein und derselben Art und zwischen verschiedenen Arten (Versuchstiere, Wildtiere; Menschen) verantwortlich sind. Diese Streuungen stellen nämlich bei der umwelttoxikologischen Abschätzung lebenslang zumutbarer täglicher Aufnahmemengen solcher Stoffe eine besondere Unsicherheit dar.

6. Befunde zur strukturellen Multiplizität des "Cytochrom P-450".

Schon bisher bot die differentielle Expression einzelner P-450 - Isoformen ausgezeichnete Gelegenheit, Grundfragen der Mechanismen zu untersuchen, von denen Expression, Multiplizität und enzymatische Eigenschaften der damit befaßten Proteine bestimmt werden. Dies ließ sich bereits 1982 bis auf die Ebene der Bereitstellung der erforderlichen mRNA - Sequenzen verfolgen (47).

Hinsichtlich der Regulation von phänotypischer Expression und enzymatischen Eigenschaften des mikrosomalen "Cytochrom P-450" ist die Leber des NZW-Kaninchens am besten untersucht. Die folgende Zusammenstellung wird sich im wesentlichen darauf beschränken. Sie soll metabolische Bedeutung und funktionelle Vielfalt des "Cytochrom P-450" belegen, und zeigen, daß sich beide Phänomene am zwanglosesten durch Annahme einer hochgradigen strukturellen Multplizität dieses Enzymsystemes erklären lassen.

Man kennt mehrere Modi der Regulation von Expression und katalytischer Aktivität des "Cytochrom P-450". Am besten bekannt ist die Induktion bestimmter P-450 - Isoformen durch Umweltchemikalien (40, 48). Von besonderer physiologischer Bedeutung dürften schon seit längerer Zeit bekannte Geschlechtsunterschiede im Metabolismus mancher Substrate sein (49,50). Sie können teilweise erst durch zusätzliche Belastung der Versuchstiere mit Cadmium sichtbar gemacht werden (51 - 53). Bestimmte P-450 - Isoformen lassen sich in vivo durch Hormone, z.B. Glucagon (54), Glucocorticoide (55 - 57) oder Androgene (52, 53) induzieren. In Ratten z.B. senkt sich nach Entnahme der Nebenniere der mikrosomale Gehalt

an "Cytochrom P-450" in der Leber um 30% (58).

Ontogenetische Unterschiede der phänotypischen Expression verschiedener Aktivitäten des mischfunktionellen Monoxygenase-Systems wurden in (59) erstmals zusammengestellt. Wahrscheinlich sind sie ebenfalls eine Funktion des hormonellen Status, z.B. von Glucocorticoiden (55). Hydroxylierung und Synthese von Gallensäuren unterliegen einer endogenen Regulation durch Substrat-Vorläufer (60, 61). Auch die selektive Stimulierung (62, 63) und Hemmung (28) bestimmter Reaktionswege durch eine Reihe von Effektoren *in vitro* sei hier erwähnt.

Untersuchungen zur Induzierbarkeit des mikrosomalen Multienzymsystems "Cytochrom P-450" durch Xenobiotica ließen als erste vermuten, daß die Induktor-ausgelöste differentielle phänotypische Expression einzelner P-450 - Isoformen einen wichtigen Modus ihrer Regulation darstellt. Der Induktionsvorgang selbst war schon Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die Verbindungen TCDD,MC und BNF führen nach Verabreichung an Versuchstiere (Kaninchen,Maus,Ratte) zum Auftauchen einer wechselnden Anzahl von P-450 - Isoformen,deren gemitteltes Absorptionsmaximum von 450 auf ca. 448 nm verschoben ist,sowie zu einer 2- bis 3-fachen Zunahme des mikrosomalen Gehalts an "Cytochrom P-450",gemessen als "Cytochrom P-448". Parallel dazu sind über 20 einzelne Monoxygenase-Aktivitäten erhöht (64).

Eine interessante Zusammenstellung von Einzelheiten der Induktion des "Cytochrom P-448" durch TCDD,MC oder BNF findet sich bei Whitlock et al. (65),so z.B. der Hinweis,daß die genannten Verbindungen mit Glucocorticoiden auf der Transskriptionsebene synergistisch wirken bezüglich der Induktion der Tyrosin-Aminotransferase,einem Leitenzym der physiologischen Wirkung dieser Hormonfamilie (66).

Ein anderer ,bereits mehrfach erwähnter xenobiotischer Induktor ist das Phenobarbital (PB). Er unterscheidet sich von den vorgenannten dadurch, daß nach Induktion durch ihn die Soret-Bande nicht nach 448 nm verschoben ist.Auch hatte schon 1972 Gillette (67) darauf hingewiesen , daß PB im Gegensatz zu MC auch die mikrosomale Cytochrom P-450 - Reduktase induziert. Die Reduktion des Fe^{+++} zu Fe^{++} aber scheint der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der in (29) dargestellten Reaktionsfolge zu sein. Damit wäre erklärt, warum PB wesentlich mehr einzelne Monooxygenase-Aktivitäten induziert als MC, dem lediglich die spezifische Induktion einzelner P-450 - Isoformen, nicht aber der Reduktase zugeschrieben wird. Den noch weithin aktuellen Kenntnisstand zur Induktion von "Cytochrom P-450" durch PB auf der zellulären Ebene hat Rees beschrieben (68).

Ergebnisse aus Translationsstudien an PB-induzierter mRNA sind hier allerdings noch nicht eingeflossen; sie sollen in der Diskussion aufgegriffen werden.

Zusammenfassend haben die genannten Induktionsstudien an Tieren und Zellkulturen Aufklärung darüber gebracht, daß man im engeren Sinn im mikrosomalen "Cytochrom P-450" Unterklassen zu unterscheiden hat ("P-450" und "P-448") und daß viele der dort nachgewiesenen Aktivitäten unabhängig voneinander experimentell zur Expression gebracht werden können. Weitergehende Fragen nach der pro Unterklasse induzierten Anzahl von Isoformen und ihrer Substrat- und Produktspezifität mußten im Rahmen dieser experimentellen Ansätze jedoch unbeantwortet bleiben.

Ein direkterer Ansatz zur Untersuchung der "Cytochrom P-450" - Multiplizität besteht in Isolierung und Charakterisierung vermuteter Isoformen und anschliessender Abschätzung ihres Anteils am intakten Cytochrom des betreffenden Organs. Die damit zu gewinnende quantitative Aussage ist desto zuverlässiger, je größer die Gewissheit ist, mit der isolierten Isoform ein homogenes Protein in Händen zu haben. Da die Leber des Kaninchens groß genug ist, um einzeln als Ausgangsmaterial einer bestimmten Isoform zu dienen, wurden an diesem Organ modellhaft die ersten und bisher erfolgreichsten Anstrengungen dieser Richtung unternommen.

Aus der Leber von NZW-Kaninchen wurden bisher mindestens 8 verschiedene Isoformen des "Cytochrom P-450" isoliert. Man bezeichnet sie heute in der Reihenfolge abnehmender elektrophoretischer Beweglichkeit in SDS-haltigen Gelen als die Isoformen 1;2;3a;3b;3c;4;5;6. Einige von ihnen sind in Abb.3 dargestellt. Sie unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit, sondern auch durch ihre spezifische Immunoreaktivität, ihre durch verschiedene Hydrolyse-Methoden erzeugten Peptidkarten sowie die Aminosäuresequenz am NH_2-Terminus (21).

Durch solche vergleichenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß sich einige der elektrophoretisch unterscheidbaren Isoformen bezüglich ihrer Primär- und Sekundärstruktur wesentlich stärker voneinander unterscheiden, als bisher bekannte Isoformen anderer, funktionell nicht dem "Cytochrom P-450" verwandter Enzymfamilien. Die weitergehende Frage nach dem Ausmaß des dieser Beobachtung zugrunde liegenden genetischen Polymorphismus und der Regulation seiner phänotypischen Expression ist nach wie vor offen, wird aber in neuester Zeit auf der Transskriptionsebene bearbeitet (s. Diskussion). Dies mag auch ein allgemeiner Weg sein, auf dem sich klären läßt, aus wievielen Subformen eine

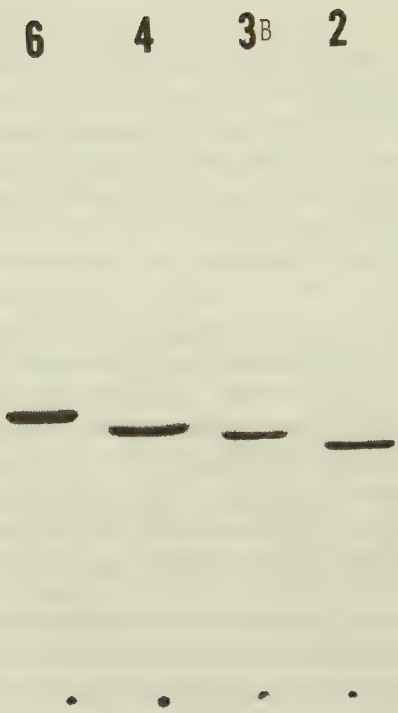


ABBILDUNG 3: Polyacrylamid (7.5%) / Flachgel - Elektrophorese der P-450 - Isoformen 2;3b;4 und 6 aus Kaninchenleber. Durchführung der Elektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat und Puffersystem sind bei Laemmli beschrieben (105). Wanderungsrichtung von oben nach unten. Jede Bahn (nominelle Ausmaße: 8 x 100 x x 1.5 mm) enthält ca. 4 µg Protein.

elektrophoretisch als einheitlich erscheinende Isoform im Einzelfall zusammengesetzt sein könnte.

Momentan liefern allerdings, wie auch diese Arbeit zeigen wird, "traditionelle" Methoden noch die schlüssigeren Ergebnisse, so z.B. bei der Abschätzung des Anteils, den einzelne Isoformen unter bestimmten Bedingungen innerhalb des gesamten mikrosomalen Cytochroms einnehmen. In der Leber des erwachsenen NZW-Kaninchens überwiegt Isoform 4 nach Behandlung des Tieres mit BNF, MC oder TCDD (69). Sie kann dann bis zu 50% des Gesamt-Cytochroms ausmachen. Einen ähnlich hohen Anteil repräsentiert Isoform 2 in PB-behandelten Tieren (70). Isoform 6 läßt sich durch TCDD ebenfalls induzieren, jedoch in einer von Isoform 4 völlig verschiedenen Alters- und Organabhängigkeit (71, 72). Abschätzungen aus elektrophoretischen Studien und Rückrechnungen aus Reinigungen der Isoform 4 und 6 zeigten überdies, daß Isoform 6 in der Leber des unbehandelten erwachsenen Tieres zu weit geringerem Ausmaß vertreten ist als Isoform 4.

Vergleicht man die katalytischen Aktivitäten von Mikrosomen aus TCDD-behandelten Tieren mit bestimmten, von Isoform 4 und 6 katalysierten Aktivitäten, so ergeben sich einige der erwarteten Übereinstimmungen. Isoform 6 hydroxyliert aromatische Kohlenwasserstoffe (gemessen als 3-Hydroxybenz(a)pyren) ca. 100-mal schneller als Isoform 4. Dieselbe Aktivität ist auch in den Mikrosomen neugeborener Tiere stark erhöht, wenn den Muttertieren pränatal TCDD verabreicht wurde (30). Beide Befunde zusammen sprechen dafür, daß in der Leber neugeborener Tiere tatsächlich überwiegend Isoform 6 durch TCDD induziert wird (73). Isoform 4 dagegen katalysiert die N-Hydroxylierung von 2-Acetylaminofluoren ca. 100-mal schneller als Isoform 6, ganz in Analogie zur Erhöhung dieser Aktivität in Mikrosomen erwachsener Tiere nach deren Behandlung mit TCDD. Dennoch ist 2-AAF auch für Isoform 6 ein Substrat und zwar für die Hydroxylierung an C-7 (30).

Obwohl sich demnach beide Formen als Benz(a)pyren- bzw. stereospezifische 2-AAF - Hydroxylase bezeichnen lassen und sie als solche auch in Mikrosomen identifiziert wurden, versagt dieses einfache Bild bezüglich der Substrate Biphenyl und Äthoxyresorufin. Beide Isoformen katalysieren die O-Deäthylierung von Äthoxyresorufin und die 4-Hydroxylierung von Biphenyl mit vergleichbaren Umsatzraten und lassen sich auch beide in vitro durch Benzoflavon hemmen. Dies zeigt, daß sich die funktionelle Vielfalt dieser Enzymklasse einer einfachen Vorhersagbarkeit oder Klassifizierung entlang bisher gewohnter Struktur/Aktivitäts - Beziehungen entzieht.

Als mögliche molekulare Grundlage wurden hierfür bereits auf S.3/4 zwei alternative Hypothesen genannt: Entweder besitzen Isoformen, die sich bezüglich ihrer Substratspezifität ähnlich wie Isoform 4 zu Isoform 6 verhalten, mehrere (beliebig viele) katalytisch aktive Zentren, oder sie sind ihrerseits aus weiteren (beliebig vielen) elektrophoretischen noch nicht auftrennbaren Subformen zusammengesetzt, wobei auch diese Subformen mehrere katalytisch aktive Zentren besitzen könnten.

Am obigen Beispiel der Isoform 4 und 6 hieße dies, daß TCDD altersunabhängig immer eine Biphenyl-4-hydroxylierende "Subform" von Isoform 6 induziert, altersabhängig dagegen in Neugeborenen die Arylwasserstoff-Hydroxylase ("Isoform 6") und in erwachsenen Tieren die 2-AAF - Hydroxylase ("Isoform 4") phänotypisch zur Expression bringt. Was sich aus Mikrosomen reinigen und elektrophoretisch sichtbar machen läßt wäre dann jeweils die "mikro"heterogene Mischung mindestens zweier, proteinchemisch sehr ähnlicher "Subformen" oder Aktivitäten. Vor dem Hintergrund solcher Überlegungen ist das Kriterium der elektrophoretischen Trennbarkeit von Iso- oder Subformen (vgl. Abb.3) als Homogenitätskriterium also nicht mehr ausschlaggebend.

Ein weiteres Beispiel: Von PB ist bekannt, daß es in der Leber zwei verschiedene, allerdings elektrophoretisch trennbare, Cytochrom P-450 - Isoformen induziert, Isoform 2 (70, 74) und Isoform 5 (75,181). Da beide Isoformen in Kaninchenlunge konstitutiv vorkommen (76, 77), liefert nach heutigem Kenntnisstand auch das Kriterium der differentiellen experimentellen Induzierbarkeit der einen oder anderen Cytochrom P-450 - Isoform keinen verläßlichen Hinweis darauf, ob eine bestimmte Subform, selbst wenn sie nicht induzierbar scheint, nicht doch, wenn auch in sehr geringer Menge, mit einer "bekannten" Isoform während der Reinigung ko-chromatographiert und sich bei der elektrophoretischen Trennung in SDS wegen gleichen Molekulargewichts identisch verhält.

Zur Ausschaltung möglicher Komplikationen bei der Bestimmung der strukturellen Multiplizität des mikrosomalen "Cytochrom P-450" ist es also ratsam, das Interesse auf solche elektrophoretisch trennbare Isoformen zu richten, die bereits unter natürlichen Bedingungen in ausreichender Menge in dem interessierenden Organ vorkommen. Wie Isoform 3a zeigt, deren Induzierbarkeit durch Äthanol erst vor kurzem entdeckt wurde (78), sagt dieses Auswahlkriterium selbstverständlich nichts darüber aus, ob es nicht doch (endogen oder exogen hervorgerufene) Bedingungen geben könnte, unter denen die zu charakterisierende Form unerwarteterweise vermehrt vorkommt. Mindestens drei Isoformen jedoch, deren Induktion durch exogene oder endogene Induktoren bisher nicht nachzuweisen war,

lassen sich in guter Ausbeute aus Kaninchenleber isolieren.

Isoform 1, bis 1977 noch als Isoform a (73) bezeichnet, wandert in der SDS-PAGE etwas schneller als Isoform 2 (vgl. Abb.3). Zwei weitere liegen bezüglich ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit zwischen den Isoformen 2 und 4 und wurden mit den Bezeichnungen 3b und 3c belegt (79). Die Präparationen von Ingelman-Sundberg et al. (20) und Miki et al. (80) sind von Koop et al. (79) als Isoform 3c identifiziert worden, wogegen Isoform 3b unter der Bezeichnung "Isoform 3 " von E.F. Johnson (81) erstmals ausführlich charakterisiert wurde. Zwischenzeitlich wurde behauptet, Isoform 3b lasse sich in Kaninchenleber durch TAO induzieren (82),doch konnte dies von mir anhand der in der vorliegenden Arbeit entwickelten funktionellen Erkennungskriterien für Isoform 3b widerlegt werden (83).

Wie die folgenden einleitenden Untersuchungen zeigen werden, verdienen im Modell "Kaninchenleber" strukturelle Multiplizität und genetischer Polymorphismus der Isoformen 1 und 3b wegen ihrer mengenmäßigen Oberlegenheit über Isoform 3c besonderes Interesse.

7. Einleitende Untersuchungen und Fragestellung.

Das Thema dieser Arbeit entstammt dem zuletzt am Ende von Abschnitt I.5. angesprochenen grundsätzlichen Interesse der bewertenden Umwelttoxikologie an zuverlässigen Informationen über Ausmaß und mögliche metabolische Bedeutung von genetischem Polymorphismus und funktioneller/struktureller Multiplizität des mikrosomalen "Cytochrom P-450". Im Verlauf seiner Bearbeitung wurden pharmakokinetische, chemische und biochemische Methoden eingesetzt.

Als Versuchstier wurde aus Gründen, die schon auf Seite 13 dargestellt wurden, das weiße NZW-Kaninchen ausgewählt. Zur Verfügung stand eine lokale "random bred"- Population ("NZW-Tiere"), sowie ein genetisch definierter Inzuchtstamm mit der Bezeichnung IIIVO/J.

Zunächst wurde versucht, die Mikrosomen von 24 NZW-Tieren sowie von 8 IIIVO/J-Tieren anhand ihrer mikrosomalen Cumarin-7-Hydroxylase - Aktivität zu ordnen (vgl. S. 10). Alle Tiere wiesen jedoch dieselbe Aktivität von 0.99 ± 0.15 mU/mg auf. Innerhalb dieser beiden Populationen war also nicht ohne weiteres damit zu rechnen, den genetischen Polymorphismus unter weißen NZW-Kaninchen, wie er von Kratz und Staudinger (46) erstmals beschrieben worden war, an einzelnen Individuen untersuchen und ihn nach Möglichkeit einer bereits isolierten P-450 - Isoform zuordnen zu können.

Es galt danach, einen besseren funktionellen Ausgangspunkt im mikrosomalen Stoffwechsel der zur Verfügung stehenden Tiergruppen zur Untersuchung der strukturellen Multiplizität und des genetischen Polymorphismus des mikrosomalen "Cytochrom P-450" ausfindig zu machen. Im Hinblick auf die für Kaninchenleber bereits beschriebenen und dort auch mengenmäßig bedeutendsten konstitutiven P - 450 - Isoformen (s. voriger Abschnitt) kam zunächst nur ein endogenes Substrat als zu hydroxylierende Modellverbindung in Frage. Die Wahl fiel aus zwei Gründen auf die Steroidhormone Progesteron und Östradiol:

1) Die Identifizierung stellungs- und stereospezifischer Hydroxylierungen von Steroidhormonen durch Isoformen des mikrosomalen "Cytochrom P-450" hatte sich in der Vergangenheit bereits als leistungsfähige Methode zum Nachweis des Vorhandenseins verschiedener P-450 - Isoformen in Mikrosomen erwiesen (82, 84). Mit ihrer hohen Fettlöslichkeit bei jeweils nur geringfügig veränderter Grundstruktur, jedoch zahlreichen hydroxylierbaren Positionen, bietet diese Stoffklasse die idealen strukturellen Voraussetzungen zum Studium der Substrat- und Produktspezifität dieser Enzymgruppe,und damit auch ihrer funktionellen und strukturellen Mutiplizität.

2) Beide Hormone boten darüber hinaus den besonderen Vorteil ihrer Einbindung sowohl in anabolische wie katabolische Reaktionen, wie Abbildung 4 für Progesteron zeigt:

   In Gegenwart von Mikrosomen aus NZW-Kaninchen wird Progesteron in 21-, 6β- und 16α-Stellung hydroxyliert (85-89). Die 21-Hydroxylierung führt zur Bildung des Mineralocorticoids 11-Desoxycorticosteron (DOC) und in der Nebennierenrinde weiter zum Aldosteron.

   Demgegenüber führt die 21-Hydroxylierung von 17α-Hydroxyprogesteron weiter in die Androgen- und Östrogenreihe, eine Reaktion, die bisher nur in steroidogenen Geweben nachgewiesen wurde (35). Die Hydroxylierungen in 6β- und 16α-Stellung gelten degegen als katabolisch (vgl. jedoch Diskussion,B.6.,S.120). Für diese beiden Hydroxyprogesterone kennt man keine physiologische Funktion (90). Beim Kaninchen läßt sich lediglich 6β-Hydroxyprogesteron im Urin nachweisen.

   Östradiol wird im Säugermetabolismus in den Stellungen 2 und 16 hydroxyliert. Die Hydroxylierung in 2-Stellung ist je nach Organ von anabolischer oder katabolischer Bedeutung (35, S. 102 und 194; 91-93).

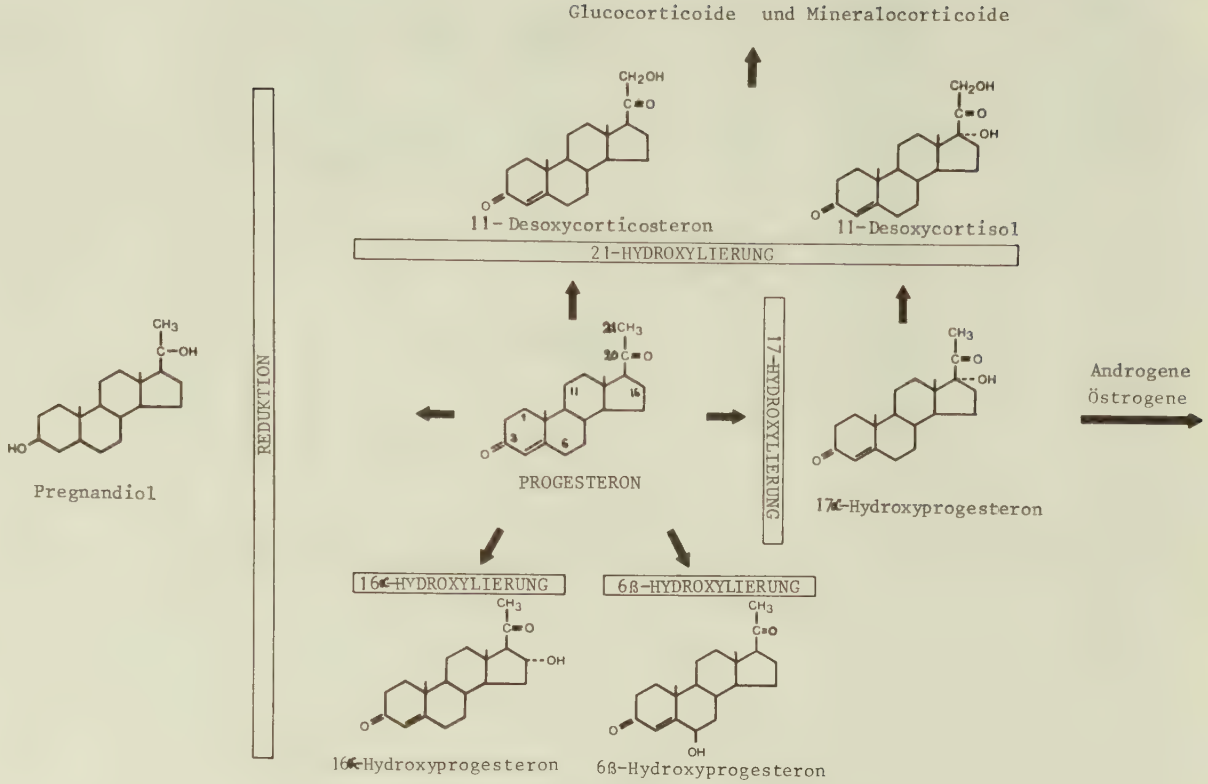


ABBILDUNG 4: Stoffwechselwege von Progesteron im Säugerorganismus.

Die Inkubation von Progesteron mit NADPH und Mikrosomen aus Einzeltieren (NZW und IIIVO/J) lieferte, wie erwartet, hauptsächhich die Hydroxylierungsprodukte 6ß-, 16α- und 21-Hydroxyprogesteron (Abbildung 5). Inkubationen, die in Gegenwart eines inhibitorischen Reduktase-Antikörpers aus Schweineserum durchgeführt worden waren, lieferten lediglich den nicht identifizierten Fleck in Abb.5. Damit war klar, daß es sich bei allen drei Hydroxylierungen um "Cytochrom P-450"-abhängige Oxidationen handeln mußte.

Auffallend war die Tatsache, daß mindestens zwei dieser Aktivitäten eine hohe bis sehr hohe interindividuelle Schwankungsbreite aufwiesen. Aus Abbildung 5 ist bereits rein visuell ersichtlich, daß es sowohl Mikrosomen mit niedriger bzw. hoher 21-hydroxylierender Aktivität (Bahnen 1,2,3,5, bzw. 4 und 6), als auch solche mit niedriger bzw. hoher 6ß-hydroxylierender Aktivität (Bahnen 2,3,5 bzw. 1,4,6) gab. Hinsichtlich der 16α-Hydroxylierung waren die interindividuellen Schwankungen dagegen weniger auffallend.

Aus diesem qualitativen Befund ergaben sich für den Fortgang der Untersuchung zunächst folgende Fragen:

1) Welche enzymkinetischen Parameter beschreiben diese 3 Hydroxylierungen ex vivo in NZW- und IIIVO/J-Mikrosomen?

2) Nach welchem statistischen Verteilungsmodus werden hohe und niedrige Aktivitäten in NZW-Mikrosomen angetroffen?

3) Wirken sich diese Schwankungen auf den Stoffwechsel von Progesteron in vivo aus?

4) Werden quantitativ vergleichbare enzymkinetische Parameter für diese Reaktionen auch in vitro mit isolierten und hochrein dargestellten P-450-Isoformen gefunden? Ist für jede dieser Hydroxylierungen eine andere Isoform zuständig?

5) Beruhen die Schwankungen zwischen Mikrosomen verschiedener Tiere bzw. Herkunft (NZW oder IIIVO/J) bezüglich der 21- und 6ß-Hydroxylase(n) auf Schwankungen des Gehalts dieser Mikrosomen an einer der bekannten P-450-Isoformen?

Die Beantwortung tiefergehender Fragen zu Biochemie und Regulation des "Cytochrom P-450" ergab sich zwanglos während der Bearbeitung dieser einleitenden Problemstellung. Dies soll jedoch nicht hier, sondern jeweils zu Beginn der betreffenden Abschnitte erläutert werden.

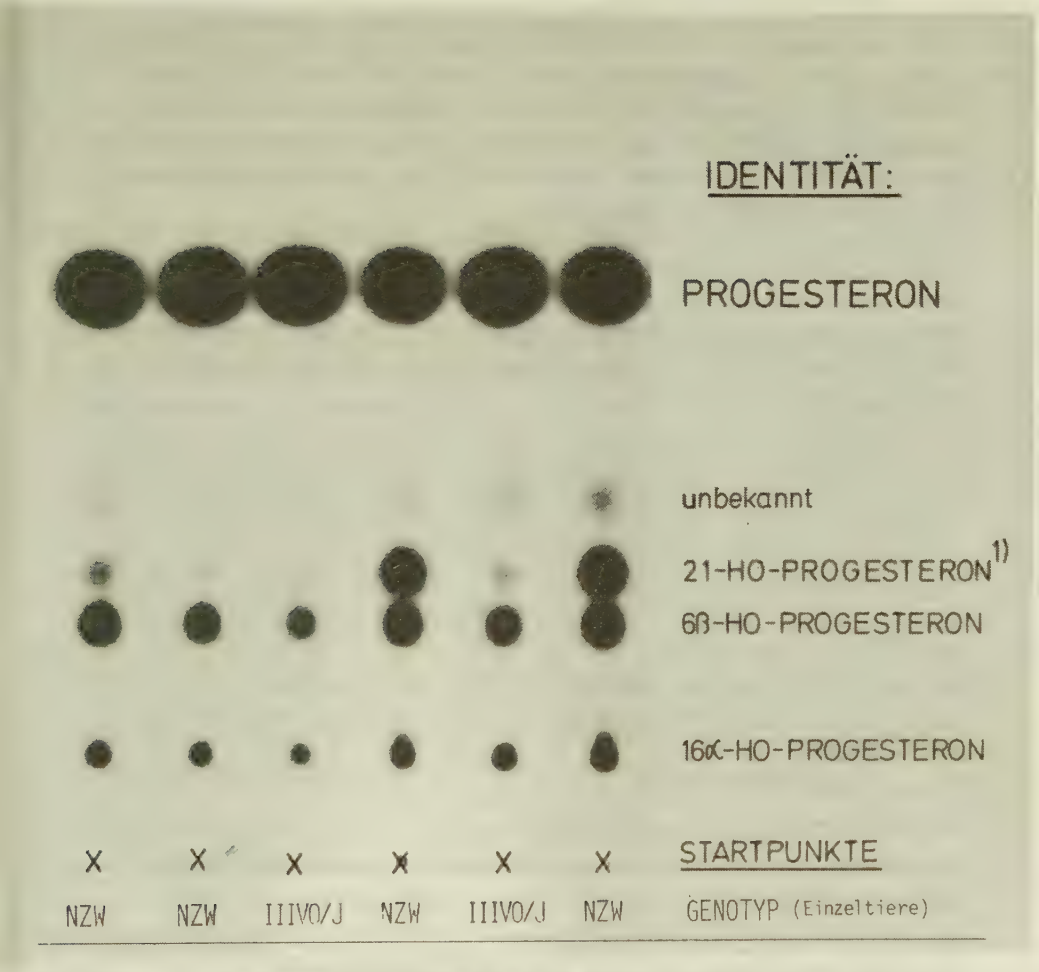


ABBILDUNG 5: Autoradiographische Wiedergabe des Metabolitmusters aus Inkubationen von Kaninchenmikrosomen mit [4-^{14}C]-Progesteron und NADPH. Jede Bahn enthält ca. 10 nMol Substanz (Metabolite + unumgesetztes Substrat) aus Inkubationen mit 30 µg mikrosomalem Protein pro Einzeltier.

II. METHODEN und MATERIAL

A. Methoden.

1. Konzentrationsbestimmungen.

Proteinbestimmungen folgten der Methode von Lowry et al. (94). Zum Ausschluß störender Einflüsse von Pufferbestandteilen wurde aus den solubilisierten Proben (10 - 200 µg Protein in 500 µl 0.013% Natrium-Desoxycholat) das Protein durch Zugabe von 500 µl 20%iger TCA ausgefällt und nach 10 Minuten abzentrifugiert (95). In den vom Überstand befreiten Röhrchen (Wasserstrahlpumpe) wurde die Farbreaktion nach Lowry angesetzt.

Gehalte an "Cytochrom P-450" in Mikrosomen und isolierten P-450 - Isoformen wurden gemäß Omura und Sato (4) mit Hilfe des Dithionit-reduzierten CO-Differenzspektrums am Zweistrahl-Photometer ermittelt. Zur Gehaltsberechnung aus der Extinktionsdifferenz zwischen 490 und 450 (448) nm diente ein Extinktionskoeffizient von 91 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$.

Die Einstellung von Steroidkonzentrationen in den methanolischen oder äthanolischen Stammlösungen erfolgte unter Verwendung eines molaren Extinktionskoeffizienten von 17 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$ (240 nm) für Progesteron und von 2.15 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$ (281 nm) für Östradiol (96). Der molare Koeffizient von 17 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$ wurde nach gravimetrischer Überprüfung auch für 16α-Bromacetylprogesteron und 16α-Methylprogesteron verwendet. Die Konzentrationseinstellung der übrigen verwendeten Steroide und Xenobiotica erfolgte gravimetrisch unter Zugrundelegung des vom Hersteller angegebenen Gehaltes (98 - 100%) und einer Mindesteinwaage von jeweils 5 mg. Organische Stammlösungen wurden gasdicht bei -20°C aufbewahrt.

2. Aktivitätsbestimmungen.

a) Testsysteme

Aktivitätsbestimmungen wurden entweder im Rekonstituierten System oder in Gegenwart von Mikrosomen durchgeführt. Rekonstituierte Systeme (14; Details:74) enthielten 0.1 nMol der jeweils untersuchten P-450 - Isoform, 0.5 U oder 0.17 nMol Cytochrom P-450 - Reduktase, 30 µg Dilauroyl-L-a-Lecithin, 500 nMol NADPH und 1% Methanol oder 0,5% Methanol + 0,5% Äthanol aus Substrat- und Effektor-Stammlösungen in einem Endvolumen von 1 ml 50 mM Glycerin-freiem KPi, pH 7.4. Tests zur Bestimmung mikrosomaler Enzymaktivitäten enthielten nur 30 - 50 µg mikrosomales Protein anstelle von gereinigter Cytochrom P-450 - Isoform, Reduktase und Lecithin.

Zwischen der Geschwindigkeit der untersuchten Umsetzungen und der Enzymkonzentration bestand Proportionalität, sofern nicht mehr als 0.5 nMol P-450 bzw. 200 µg mikrosomalen Proteins eingesetzt wurden.

b) Metabolismus von Progesteron: Vorberechnete Mengen an [4-^{14}C] -Progesteron und, wenn nötig, an Effektor wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl Methanol mit 940 µl Inkubationsmischung (Rekonstituiertes System oder Mikrosomen ohne NADPH) vermischt. Lediglich 16α-Bromacetylprogesteron wurde in Äthanol zugegeben, da es in Methanol nicht stabil war (s.S. 28).

Nach einer Vorinkubationsperiode von 3 Minuten bei 37°C erfolgte der Reaktionsstart durch Zugabe von 500 nMol NADPH in 50 µl Kaliumphosphatpuffer mit anschließender Inkubation im Schüttelwasserbad (100 Oszillationen pro Minute) bei 37°C. Die Inkubationszeit für Einpunktmessungen (Substrat-Konzentrationen 10 und 45 µM) betrug 2.5 bis 5 Minuten und wurde nach Vortests für die einzelnen Ansätze so eingestellt, daß - je nach Substrat-Konzentration - die Reaktionsgeschwindigkeit von der Inkubationszeit unabhängig war. Falls erforderlich, wurden noch kürzere Zeiten (bis herab zu 1 Minute) gewählt um sicherzustellen, daß insbesondere bei sehr niedrigen Substrat-Anfangskonzentrationen (unter 3 µM) nicht mehr als insgesamt 10% des eingesetzten Substrates umgesetzt wurden. Dadurch und durch Verwendung des Mittelwertes aus Anfangs- und Endkonzentration des Substrats ($\bar{S}$) für die graphische Ermittlung der kinetischen Parameter war garantiert, daß der Substrat-Verbrauch keinen nennenswerten Fehler in die V_{max}- und K_m-Bestimmungen einführte (97). Die Substrat-Anfangskonzentrationen überschritten diejenige des Cytochroms (Rekonstituierte Systeme) um mindestens das 8-fache, lagen andererseits aber auch nicht höher als 60 µM, der Löslichkeitsgrenze für Progesteron in wässriger Lösung (98).

Nach der vorbestimmten Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 9 ml Chloroform und kräftiges 1-minütiges Schütteln beendet, gleichzeitig die Metabolite in die organische Phase überführt. Ihre prozentuale Ausbeute war unabhängig von ihrer Polarität und Konzentration, wie Metabolit-Kontrollextraktionen in Gegenwart von nichtradioaktivem 6ß-,16α- und 21-Hydroxyprogesteron zeigten. Bekannte Anteile (5/9 bis 8/9) der organischen Phase wurden nach Absaugen der wässrigen Phase bei ca. 45°C unter einem Stickstoffstrom in konisch zulaufenden Reagenzröhrchen eingetrocknet. Nach möglichst vollständiger Wiederauflösung der Substrat- und Metabolitmischung in 25 µl Äthylacetat (Benetzung der Reagenzglaswand und unmittelbar anschließende Zentrifugation für 30 Sekunden) erfolgte ihre Auftrennung durch Dünnschichtchromatographie an KG 60. Zur Überführung der

Proben aus den Röhrchen auf die Startlinie der Platte dienten Dochte aus hydrophobem Material mit einem Aufnahmevermögen von ca. 30 µl. Zur Auftragung (Desorption) der Metabolite von den getrockneten Dochten kam ein halbautomatisches Auftragegerät der Fa. Analytichem International zu Verwendung. Die Dochte tauchen dabei mit einem Ende in einen Chloroform-Vorrat ein, wodurch es zu einem kapillaren Transport von Chloroform zu der auf den Dochten aufliegenden Dünnschichtplatte kommt. Nach 5 - 10 Trocknungsvorgängen (Warmluftstrom) von je 1/2 bis 1 Sekunde Dauer ist die Metabolit- und Substratmenge aller Dochte mit dem kapillar nach oben steigenden Chloroform-Strom getrennt auf die Startpunkte der Platte überführt. Die Trennung erfolgte anschließend in zwei aufeinanderfolgenden Stufen in dem Laufmittelsystem Diisopropyläther: Aceton = 80:20 (Stufe 1) und Benzol: Äthylacetat: Aceton = 80:10:10 (Stufe 2) (99).

Substrat und Reaktionsprodukte wurden autoradiographisch sichtbar gemacht (vgl. Abb. 5), anschließend die den Flecken entsprechenden Kieselgel-Anteile in Flüssigszintillationsfläschchen überführt und ohne weitere Aufarbeitung die darin enthaltenen Substanzmengen durch ß-Zählung in einem käuflichen Szintillator für wasserfreie Proben quantifiziert. Die Zählausbeute betrug unabhängig von der KG-Menge in den Fläschchen 91± 2%. Als spezifische Radioaktivität wurden in die Berechnung 112000 [^{14}C]-cpm/nMol (Produkte oder Substrat) eingesetzt.

Die Gesamtausbeute an Produkt plus Substrat über den gesamten Aufarbeitungsgang (Extraktion bis Szintillationszählung) variierte mit 85 ± 10 % beträchtlich. Hierfür war die quantitativ unterschiedliche Aufnahme der Proben durch die Dochte aus den Reagenzröhrchen verantwortlich. Die Gesamtausbeute an Produkten und Substrat wurde deshalb für jeden Inkubationsansatz getrennt ermittelt und danach die durch Szintillationszählung gemessenen Substanzmengen pro Fleck mit dem entsprechenden Faktor auf 100% Ausbeute hochgerechnet. Die Division durch Inkubationszeit und Protein- (Cytochrom-) Menge lieferte für jeden Fleck die Aktivität des betreffenden Ansatzes in mU/mg Protein (mU/nMol P-450).

c) 2-Hydroxylierung von Östradiol: Die Bestimmung dieser Aktivität wurde entsprechend einem von Paul und Axelrod angegebenen 2-stufigen Verfahren durchgeführt (100). Das in Gegenwart von Mikrosomen oder rekonstuierter P-450 - Isoform nach den festgesetzten Inkubationszeiten gebildete 2-Hydroxy-östradiol wurde zunächst mit frischem, wasser- und peroxidfreiem Diäthyläther (9 ml) innerhalb 30 Sekunden aus den Inkubationsansätzen extrahiert und die organische Phase unter einem Stickstoffstrom bei Raumtemperatur zur Trockne

gebracht. Seine anschließende Bestimmung als "Gesamtsumme Katecholöstrogene" folgte den Angaben in (100) mit dem Unterschied, daß nicht selbst präparierte, sondern in kleinen Portionen eingefrorene und jeweils nur einmal aufgetaute COMT verwendet wurde. Parallel zu jedem Versuch wurde eine Eichkurve (Ansatz ohne NADPH, bekannte 2-Hydroxyöstradiol-Mengen) angefertigt.

d) Exogene Substrate: Umsetzungsgeschwindigkeiten exogener Substrate wurden nach folgenden Methoden bestimmt: Aminopyrin und Benzphetamin durch Quantifizierung des freigesetztem Formaldehyds (101), Benzo(a)pyren und Biphenyl durch quantitative Erfassung der Fluoreszenz des gebildeten 3-Hydroxybenzo(a)-pyren (102) bzw. von 4-Hydroxybiphenyl (103), Deäthylierung von 7-Äthoxy-resorufin durch Bestimmung von Resorufin (104).

Einzelheiten hinsichtlich der angewandten Inkubationsbedingungen, Reaktionszeiten, Substrat-Konzentrationen und sonstige Modifikationen der zitierten Methoden finden sich für Benzo(a)pyren in (71), für Biphenyl und 7-Äthoxy-resorufin in (74), mit der einzigen Abänderung, daß nicht nur für die beiden letzten, sondern für alle drei Substrate der pH-Wert der Inkubation auf 7.7 eingestellt wurde (81). In (81) finden sich auch die modifizierten Einzelheiten der Quantifizierung des Umsatzes von Aminopyrin und Benzphetamin.

3. Trennmethoden (TLC: s. II.A.2.b).

a) Elektrophoresen

Die elektrophoretische Untersuchung (SDS-PAGE) von Mikrosomen und isolierten P-450-Isoformen erfolgte in Gegenwart von SDS in einem von Laemmli beschriebenen Puffersystem (105), Anfärbungen wie in (71). Weitere Einzelheiten der Durchführung der Elektrophoresen finden sich bei den jeweiligen Abbildungen. Zur elektrophoretischen Auftrennung proteolytisch erhaltener Bruchstücke isolierter P-450 - Isoformen wurde eine von Cleveland (106) erstmals angewandte und in (107) detailliert beschriebene Methode benutzt. Die dort genannten Bedingungen gelten auch für die elektrophoretischen Peptidkartierungen dieser Arbeit.

b) HPLC: Das von Calciumphosphatgel desorbierte Cytochrom (vgl. II.B.2.) wurde zur Vorbereitung der tryptischen Verdauung gegen 0.2 M $(CH_3COO)NH_4$ pH 7.4 dialysiert und lyophilisiert. Die trypischen Peptide (108) aus 4 nMol der jeweiligen P-450 - Isoform wurden durch HPLC in umgekehrter Phase getrennt. Als Sorptionsmittel diente µBondapak C_{18}, zur Elution ein linearer Gradient von Acetonitril (0 - 70%) in 0.1% (v/v) Phosphorsäure. Eluierte

Peptide wurden anhand ihrer UV-Absorption in einer Durchflußzelle bei 210 nm erfaßt. Die Reinheitsüberprüfung des synthetisierten 16α-[α-^{3}H]-Bromacetylprogesterons durch HPLC erfolgte im selben System mit dem einzigen Unterschied,daß als polare Komponente Wasser statt verdünnter Phosphorsäure eingesetzt wurde.

4. Struktur- und Einheitlichkeitsnachweis für 6ß-, 16α-, und 21-Hydroxyprogesteron.

Vorläufige Identifizierung und Einheitlichkeitsnachweis der genannten Metabolite fußten auf ihrer autoradiographischen Untersuchung durch Dünnschichtchromatographie in 10 Laufmitteln unterschiedlicher Polarität, sowie dem Vergleich ihrer relativen Mobilität in diesen Systemen mit derjenigen entsprechender authentischer Verbindungen. Definitiv wurden Struktur und Einheitlichkeit aller drei als Metabolite erhaltenen Verbindungen nach methanolischer Elution von der Dünnschichtplatte durch Massenspektrometrie bewiesen. Die Spektren wurden nach direkter Injektion der Proben in ein Finigan GC/EI-CI MS-System, Modell 4021 (70 eV) erhalten. Das Haupt-Ion von 16α-Hydroxyprogesteron lag bei einem m/e-Wert von 231, andere Peaks bei m/e-Werten von 312, 297, 270 und 269. Das Haupt-Ion von 6ß-Hydroxyprogesteron lag dagegen bei m/e = 330, die übrigen Peaks bei m/e = 315, 312, 299,287 und 227. Für 21-Hydroxyprogesteron (DOC) wurden m/e-Werte von 229 (Haupt-Ion) sowie von 271,253,229, 161 und 147 gemessen. Die Spektrendieser drei Metabolite waren mit denjenigen der parallel dazu untersuchten authentischen und durch Dünnschichtchromatographie gereinigten Verbindungen identisch.

5. Synthese von 16α-[α-^{3}H]-Bromacetylprogesteron (3 Schritte;a-c).[1)]

a) Darstellungen von 16α-Hydroxyprogesteron aus 16α.17α-Epoxyprogesteron durch dessen Reduktion mit Chrom(II)acetat

Darstellung von Chrom(II)acetat: In Anlehnung an Angaben in (109) wurden 10 g $CrCl_2$ (0.08 Mol) in 35 ml 2 N HCl gelöst und mit 60 g CH_3COONa (0.072 Mol) in 78 ml H_2O versetzt. Das grüne Fällungsprodukt Chrom(II)acetat wurde auf einem Büchner-Trichter abgesaugt und zunächst mit Wasser, dann mit absolutem Äthanol und Diäthyläther gewaschen. Alle Lösungen bzw. Lösungsmittel und das Waschwasser wurden vor ihrer Verwendung durch 10-minütiges Aufkochen und Zugabe eines Überschusses Trockeneis (Wasser, wässrige Lösungen außer HCl) bzw. 20-minütiges Durchperlen mit einem Leuchtgasstrom (2 N HCl; Abzug!) sauerstoffrei gemacht, da Chrom(II)acetat in Gegenwart von Sauerstoff und Wasser sofort zu Chrom(III)acetat oxidiert. Auch die Reaktionsmischung wurde bis zum Absaugen mit einem Leuchtgasstrom begast. Ausbeute von Chrom(II)acetat (theoret.): 11.7 g (0.08 Mol). Es

[1)] Die Synthese wurde in allen drei Schritten in einem entsprechen ausgestatteten Sicherheitslabor durchgeführt.

wurde ohne Abwiegen direkt aus dem Trichter quantitativ für die Darstellung von 16a-Hydroxyprogesteron verwendet:

Darstellung von 16α-Hydroxyprogesteron: Noch vor Beginn des vorigen Ansatzes wurden 5 g 16α.17α-Epoxyprogesteron (15 nMol) in 60 ml Eisessig (v/v) gelöst und mindestens 30 Minuten lang schwach mit Trockeneis gerührt. Danach wurde das aus dem vorigen Ansatz erhaltene Chrom(II)acetat möglichst unter Luftausschuß (Leuchtgasstrom) rasch zugegeben und unter CO_2 im verschlossenen Gefäß (Parafilm) weitergerührt. Nach 14 Stunden war die Grünfärbung durch Chrom(II)acetat verschwunden und die Lösung klar. Es wurde reichlich Wasser zugegeben, 2-mal mit dem doppelten Volumen Methylenchlorid extrahiert, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration am Rotovapor abgezogen. Der Rückstand wurde 2-mal aus 50%igem wässrigem Methanol umkristallisiert. Ausbeute: 5.2 mMol (=34% d. Th.) bzw. 1.7 g Schmelzpunkt: 227°C (110).

b) Darstellung von [α-^{3}H]-Bromessigsäurebromid in Gegenwart von rotem Phosphor. Nach Vorversuchen im gleichen Maßstab gem. (111) wurden 5 mMol [α-^{3}H]-CH_3COOH (20 mCi/mMol; 302 mg) mit 1.5 mMol rotem Phosphor (46.5 mg) bei RT gemischt und 5 mMol Br_2 (800 mg) mit einer solchen Geschwindigkeit zugetropft, daß in der Gasphase keine Bromfarbe auftrat. Die Reaktionstemperatur wurde auf 40 - 50°C gehalten (Silikonölbad). Nach Zugabe der ersten Bromportion wurden rasch nochmals 5 mMol Br_2 zugetropft, das dabei entstehende [^{3}H]Br in einer KOH-Waschflasche aufgefangen. Nach 48-stündigem Rühren bei 40°C war die Lösung blaßgelb gefärbt. Zur Aufarbeitung wurde mit 5 mMol H_2O (90 mg) versetzt, 5 bis 10 Minuten unter Rückfluß auf 140°C erhitzt und anschließend direkt im Vakuum destilliert (Mikrodestillationsbrücke). Ausbeute: 2.25 mMol [α-^{3}H]-$BrCH_2COBr$ (30 mCi mit 13.3 mCi/mMol) bzw. 420 mg (= 45% der Theorie).

c) Synthese von [^{3}H] -BrAcP aus 16α-Hydroxyprogesteron und [α-^{3}H]-$BrCH_2COBr$. Die Synthese und Reinigung des Steroid-Analogen mit reaktiver Seitenkette folgte ungefähr den Angaben in (110). 330 mg 16α-Hydroxyprogesteron (1.0 mMol), 30 mCi [α-^{3}H]-$BrCH_2COBr$ (13.3 mCi/mMol) und 257 mg Dicyclohexylcarbodiimid und 50 µl wasserfreies Pyridin wurden in einem Endvolumen von 6.75 ml Methylenchlorid zur Reaktion gebracht. Sobald in der Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Laufmittelsysteme 1 und 2) kein 16α-Hydroxyprogesteron mehr zu erkennen war, wurde wie in (110) angegeben aufgearbeitet, nach dem zweiten Aceton-Abzug jedoch in 5 ml Äthanol aufgenommen und in 300 ml Diäthyläther bei 0°C eingetropft. Nach 15-stündigem Stehen bei -20°C wurde der Diäthyläther abgezogen, der Rückstand in wenig Laufmittel (Stufe 1;s.S.24) aufgenommen und über eine KG 60-Säule (Füllungsmaße: 20cm x 1 cm^2) im selben Laufmittel gereinigt. Von 10600 aufgetragenen OD_{241} wurden 9100

eluiert, also insgesamt 535 µMol.

Die anhand des Extinktionskoeffizienten berechnete spezifische Radioaktivität des gereinigten Produktes betrug wie erwartet 13.3 mCi/mMol, entsprechend einer Produkt-spezifischen Tritium-Gesamtausbeute von 7.1 mCi (24% bezogen auf Beginn von Schritt c). Zur Schmelzpunktbestimmung wurde aus 95%igem Äthanol umkristallisiert. Wie in (110) angegeben wurden 120 - 122°C gemessen. Auch die charakteristischen IR-Banden (KBr) stimmten mit den Angaben in (110) überein (Wellenzahlen: 1728 cm^{-1} für -O-C =O; 1705 cm^{-1} für C_{20}=O; 685 cm^{-1} für (O-CO-CH_2Br; 3400 cm^{-1} für 16α-OH, nur in 16α-Hydroxyprogesteron). Radiochemisch war die Verbindung zu 99% rein (HPLC und TLC). Die Bestandteile des restlichen Prozents wurden aber ebenfalls daraufhin getestet, ob 6ß-Form 3b durch einen von ihnen gehemmt/aktiviert wurde (III.D.3.1.1., Seite 90).

6. Stabilität von 16α-[α-^{3}H] -Bromacetylprogesteron unter Testbedingungen.

Zur Aufbewahrung von [^{3}H]-BrAcP erwies sich Methanol auch für kurzfristig anzusetzende Lösungen als ungeeignet (TLC: Zersetzung in 16α-Hydroxyprogesteron und vermutlich Essigsäuremethylester). Zur Lagerung der konzentrierten Stammlösung (6 mCi/ml) bei 4°C wurde Benzol verwendet (HPLC und TLC: Keine merkliche Zersetzung innerhalb von 4 Monaten). Als Lösungsmittel für die Zugabe der Substanz in wässrige Reaktionsmischungen diente Äthanol (TLC: keine Zersetzung während mindestens 2 Wochen). In wässrigen Lösungen fand während mindestens drei Stunden bei RT und pH 7.4 keine Zersetzung (Hydrolyse) statt. Ein 100-facher molarer Überschuß an Glutathion reagierte unter denselben Bedingungen jedoch innerhalb von 5 Minuten mit 90% des anwesenden [^{3}H] - BrAcP (Nachweis durch TLC im Laufmittel d.Stufe 1 (S.24; das Kopplungsprodukt blieb am Startpunkt liegen). GSH wurde deshalb dazu verwendet, die Reaktion zwischen Protein und [^{3}H] -BrAcP nach den vorbestimmten Zeiten abzubrechen.

7. Inkubationen von Isoform 3b mit 16α-[α-^{3}H]-Bromacetylprogesteron.

a) [^{3}H]-BrAcP als irreversibler Inaktivator: 0.1 nMol 6ß-Form 3b in KPi/20% Glycerin wurde mit Glycerin-haltigem und freiem KPi so auf 240 µl aufgefüllt, daß eine Glycerin-Endkonzentration von 6% erhalten wurde. Für Inkubationen bei niedrigen und höheren pH-Werten wurde entweder 50 mM KH_2PO_4 (End-pH ca. 6) oder 50 mM K_2HPO_4 (End-pH ca. 9) statt KPi zum Verdünnen verwendet. Nach 1 Minute Vorinkubation bei RT wurden 10 µl einer 2.7 mM Lösung von [^{3}H] -BrAcP in Äthanol zugegeben und 20 Minuten weiterinkubiert. Der Reaktionsabbruch erfolgte durch Mischung mit 25 µl einer 100 mM Lösung von GSH in KPi. Zur Messung der Restaktivität wurde entsprechend den methodischen Angaben in 2a) (Rekonsti-

tuiertes System) Reduktase, Dilauroyl-L-a-Lecithin, KPi und Substrat zugegeben, bei 37°C 3 Minuten vorinkubiert und mit NADPH gestartet. Kontrolle: Zugabe von [^{3}H]-BrAcP zusammen mit GSH.

b) [^{3}H]-BrAcP als irreversibler Aktivator: 0.1 nMol 6ß$^-$-Form 3b in KPi/20% Glyc. wurden mit Glycerin-haltigem und -freiem KPi so auf 190 µl aufgefüllt, daß eine Glycerin-Endkonzentration von 6% entstand. Nach 1 Minute Vorinkubation bei 37°C wurden 10 µl einer 1 mM Lösung von [^{3}H]-BrAcP in Äthanol zugegeben und nach den vorgewählten Zeiten mit 10 µl 100 mM GSH gemischt. Zur Aktivitätsmessung wurde verfahren wie bereits im vorigen Punkt angegeben. Kontrolle: Zugabe von [^{3}H]-BrAcP zusammen mit GSH. Inkubationsansätze zur Überprüfung der Spezifität des Einbaus von [^{3}H]-BrAcP als Aktivator enthielten entweder bis zu 150 µM Bromessigsäure (Zugabe in 10 µl KPi) oder bis zu 50 µM 5ß-Pregnan-3ß.20α-Diol (Zugabe in 5 µl Methanol).

c) Bestimmung des Einbauverhältnisses ([^{3}H]-dpm):(nMol P-450) bzw. ([^{3}H]-dpm):(mg Protein). Vorversuche zum Ausmaß des kovalenten Einbaus von [^{3}H] aus der Acetylseitenkette von [^{3}H]-BrAcP in 6ß$^-$-Form 3b wurden an kleinen Enzymmengen (0.5 - 2 nMol) vorgenommen und schlossen wegen der anzuwendenden denaturierenden Bedingungen Messungen der enzymatischen Restaktivität nicht mit ein. Die Inkubationsansätze waren zusammengesetzt wie in b). Nach festgelegten Zeiten (10 bis 270 Minuten) wurde GSH zugegeben, anschließend mit KPi auf 1 ml aufgefüllt. Die Abtrennung der markierten P-450 - Isoform von nicht gebundener Radioaktivität erfolgte entweder durch Fällung mit TCA (10%; 30 Minuten) oder durch spezifische Adsorption (4°C, 90 Minuten in KPi/20% Glycerin) an einen Träger-gebundenen monoklonalen, gegen beide Varianten von Form 3b gerichteten Antikörper (MCA-A).[1] Die TCA-Präzipitate (jeweils 2 Röhrchen) wurden geteilt für Protein- und Radioaktivitätsbestimmung und aus beiden Meßgrößen das Einbauverhältnis (Molekulargewicht von Form 3b = 51000)(81) errechnet. Das MCA-A - adsorbierte Material wurde 3 mal mit KPi/20% Glycerin gewaschen, dann zur Desorption mit 125 µl Elutionspuffer (7.5% SDS in 50 mM Tris-Acetat, pH 7.4) behandelt (RT, 60 Min) und der Oberstand direkt auf [^{3}H]-Gehalt in einem mit Wasser mischbaren käuflichen Szintillator-Cocktail gezählt (Quench-Korrektur durch Vergleich mit internem Standard [^{3}H]-Toluol). Das Einbauverhältnis ergab sich bei dieser Methode durch Vergleich der im letzten Schritt gemessenen dpm mit der eingesetzten (bekannten) Menge von 6ß$^-$-Form 3b. Als Kontrollprotein für beide Methoden (mit ca. 5% des [^{3}H]-Einbaus in 6ß$^-$-Form 3b) diente Form 1. Für ihre immunchemische Präzipitation stand ebenfalls ein Träger-gebundener monoklonaler Antikörper (IF-11)[1] zur Verfügung.

---

1) Die monoklonalen Antikörper MCA-A und IF-11 wurden mir freundlicherweise von E.F.Johnson, La Jolla, zur Verfügung gestellt.

d) Darstellung und Aufarbeitung größerer Mengen permanent aktivierter 6ß$^-$-Form 3b: Typische Ansätze zur Darstellung größerer permanent aktivierter Enzymmengen enthielten 5 - 20 nMol 6ß$^-$-Form 3b (0.50 µM in KPi/20% Glycerin) sowie 0.5 - 2 µMol [^{3}H]-BrAcP (50 - 200 µl einer 10 mM Lösung in Äthanol). Die 3-stündige Inkubation bei RT wurde durch Zugabe von 50 - 200 µMol GSH in 0.5 - 2 ml KPi abgebrochen.

Zur Entfernung des GSH/[^{3}H]-BrAcP - Adduktes wurde 3 - 4 Tage bei 4^{o}C gegen 6L 5 mM KPi pH 7.4, der 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTE und 20% Glycerin enthielt, dialysiert. Nach Adsorption an einen Überschuß Calciumphosphatgel wurde in 0.2 M KPi/20% Glycerin in ein Endvolumen von 1 - 3 ml desorbiert. In dieser Lösung der [^{3}H]- markierten Isoform wurden zur Überprüfung der Korrelation zwischen [^{3}H]-Einbau und permanenter Aktivierung (vgl. Abb. 29) P-450, Protein, hydroxylierende Aktivitäten gegenüber Progesteron als Substrat (s. Einzelmethoden) sowie Tritium (cpm/ml) gemessen.

Die Aufspaltung in die trypischen Peptide und deren Auftrennung durch HPLC erfolgte unter Verwendung des Hauptteils dieser Lösung gemäß Methode II.A.3b. Zur Herstellung des sauren Total-Hydrolysats (neuer Ansatz) wurde lyophilisiert und der Rückstand in 6 N HCL 24 Stunden bei 110^{o}C gehalten. Die Behandlung der Rückstände in den Reagenzgefäßen und auf dem HPLC-Filter mit organischen Lösungsmitteln oder NaOH ist im Zusammenhang mit der Erklärung von Tabelle 10 erläutert (s.S. 95/96).

8. Bestimmung von Q (P ⟶ DOC) in Kaninchen.

Zur Bestimmung der in vivo - Umwandlungsrate von Progesteron in DOC und ihre Tabellierung als prozentualer Anteil des in DOC umgewandelten infundierten Progesterons (Fließgleichgewicht) im Plasma wurde die in (112) angegebene Methode auf das Kaninchen (rechte Ohrvene) angewendet. Die Infusionslösung wurde mit einer Geschwindigkeit von 3 ml/Std. aus einer elektrisch getriebenen Infusions-Kolbenspritze verabreicht. Das Fließgewicht bezüglich [^{3}H]-Progesteron und [4-^{14}C]-DOC (konstante Plasma-Spiegel) war nach ca. 100 Minuten erreicht. Die Hydroxylierung von [^{3}H]-Progesteron zu [^{3}H]-DOC wurde zwischen 120 und 150 Minuten Infusionsdauer bestimmt. Hierzu wurden 30 - 40 ml Blut[1] (linke Ohrvene) zunächst durch Zentrifugation (30 Minuten, 1500 g) von den Erythrozyten befreit, danach das Plasma (20 - 25 ml) 3-mal mit einem je dreifachen Überschuß von Diäthyläther: Chloroform = 3:1, angereichert mit je 100 µg Progesteron und DOC pro 100 ml, durch kräftiges Schütteln extrahiert. Die übrigen Aufarbeitungsschritte (TLC, Acetylierung von [^{3}H]- [4-^{14}C]- und "Schlepper"-DOC, Reinigung des DOC-Acetats durch TLC) folgten den Angaben in (112).

[1] Die Gerinnung der Blutproben wurde durch sofortige Zugabe einiger Körnchen Heparin pro Röhrchen (10 ml) verhindert.

Zur Kristallisation des gereinigten und mit synthetischem DOC-Acetat (40 mg) angereicherten Endprodukts auf konstantes [^{3}H] :[^{14}C] - Verhältnis (3 - 5 Kristallisationen) diente 60%iges wässriges Aceton. Aus 20 ml Plasma wurden je nach Tier 4 - 16 nCi [^{3}H] -Progesteron und 0.2 - 0.6 nCi [4-^{14}C]-DOC (als Acetat) zurückerhalten, dazu 0.5 - 1.5 nCi [^{3}H] -DOC (als Acetat), das in vivo aus dem infundierten [^{3}H]-Progesteron entstanden sein mußte. Die Zählung der [^{3}H]- und [^{14}C]-Aktivität in Aliquots des kristallinen DOC-Acetats erfolgte simultan (getrennte Kanäle, Festprogramm) in einem ß-Flüssigszintillationszähler,LS 7500, der Fa. Beckmann. Nach Standardisation auf das bekannte [^{3}H]/[^{14}C] - Verhältnis der Infusionmischung resultierten die in Tabelle 4 aufgeführten Q (P⟶ DOC) - Werte.

B. Material.

1. Tiere

NZW-Kaninchen vom Stamm IIIVO/J (Inzuchtkoeffizient größer als 0.98) stammten aus dem "Jackson Laboratories", die "random bred"- Tiere aus Zuchtstationen bei San Diego (USA) oder aus dem Tierhaus der Universität Düsseldorf. Vor der experimentellen Verwendung wurde jedes Tier (2-4 kg) während mindestens 2 Wochen an Ort und Stelle (12h/12h-Tag/Nacht-Rhythmus) akklimatisiert,bei freiem Zugang zu Wasser und Standard-Futter (Wayne Co.).

2. Mikrosomen und elektrophoretisch einheitliche P-450 - Isoformen.

24 Stunden vor dem beabsichtigten Tötungstermin wurde den Tieren das Futter entzogen. Die Präparation der Lebermikrosomen folgte dem in (113) angegebenen Verfahren, allerdings ohne Zusatz von butyliertem Hydroxytoluol. Die nach dieser Methode erhaltene Mikrosomensuspension ist durch die voraufgegangene Waschung des ersten 100000 g - Niederschlags mit Natriumpyrophosphat weitgehend Hämoglobinfrei. Mikrosomen, die für die Isolation einzelner P-450 - Isoformen bestimmt waren, wurden in 0.1 M Tris -Acetat-Puffer, pH 7.4, angereichert mit 20% Glycerin , 0.1 M KCl, 1.0 mM EDTA·Na_2 und 1.0 mM Dithiotreitol, Mikrosomen zur Isolierung der NADPH-Cytochrom P-450 - Reduktase dagegen in 0.01 M Trisacetat pH 7.4, 20% Glycerin und 0.1 mM EDTA·Na_2 suspendiert. Für die Verwendung von Mikrosomen in enzymatischen Tests dagegen diente 0.05 M KPi, pH 7.4, angereichert mit 20% (v/v) Glycerin und 0.1 mM EDTA·Na_2 als Suspensionspuffer.

Mikrosomen wurden zur Darstellung von P-450 - Isoformen mit Natriumcholat solubilisiert (113) und mit PEG fraktioniert (114). Das zwischen 6 und 14% PEG-Gehalt präzipitierende Material wurde den folgenden Angaben entsprechend weiterverarbeitet.

a) Darstellung von P-450 - Isoform 3b (beide Varianten): Soweit nicht anders vermerkt, handelt es sich bei allen im folgenden verwendeten Puffern um KPi-Puffer von pH 7.4, die 20% Glycerin, 0.3% Nonidet P-40 (ein nichtionisches Detergens), 0.1 mM EDTA und 0.1 mM Dithioerythritol enthalten. Ihre Molarität bezüglich KPi wird von Fall zu Fall angegeben. Die bereits publizierte Reinigungsmethode für Form 3b (81) wurde leicht abgewandelt insofern, als das PEG-fraktionierte und an CM-Cellulose chromatographierte Material (81) zunächst nicht auf Hydroxylapatit/Cellulose (81), sondern auf eine DEAE-Sepharose - Säule (innere Maße: 2.5 x 10 cm) in 10 mM KPi-Puffer aufgetragen wurde. Dadurch konnten zwei Dialyseschritte und ein hydrophober Chromatographieschritt eingespart werden. Durch Waschen der Säule mit 10 mM KPi wurde im Durchlauf Form 1 erhalten (Weiterverarbeitung s.u.). Durch Erhöhung der Molarität des Puffers auf 20 mM fing Form 3b an zu wandern. Es wurden ca. 250 ml Form 3b-haltiger 20 mM Puffer erhalten. Nun wurde die Cytochrom-Lösung durch Zugabe von konzentriertem Puffer 30 mM an KPi gemacht und auf eine HA-Agarose - Säule (innere Maße: 2 x 15 cm) aufgetragen, diese anschließend mit 100 ml 35 mM KPi gewaschen. Form 3b-haltige Fraktionen wurden mit 65 mM KPi eluiert. Sie wurden über Nacht gegen 5L 5 mM KPi dialysiert und danach zur Konzentrierung und Befreiung von Detergentien an Calciumphosphatgel adsorbiert und in Detergens-freiem 0.3 M KPi wieder desorbiert (81). Die mittlere Ausbeute an Cytochrom P-450 in dieser Fraktion betrug 4%, bezogen auf die eingesetzte Menge an Cytochrom P-450 vor der Solubilisierung der Mikrosomen mit Natriumcholat. Sie enthielt ausschließlich Form 3b (je nach Tier die $6\beta^+$- oder $6\beta^-$-Variante) mit einem spezifischen Gehalt von 16-19 nMol P-450/mg Protein. Sie wurde für weitere Untersuchungen bei -80^oC gelagert.

b) Darstellung von P-450 - Isoform 1: Isoform 1 ist hinsichtlich ihrer Substratspezifität und ihres Verhaltens in der SDS-PAGE identisch mit der bereits 1977 vorläufig beschriebenen Form a (73), wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr als Seitenfraktion von Form 6 (73), sondern von Form 3b (beide Varianten) erhalten. Ihre elektrophoretische Reinheit konnte dadurch erheblich verbessert werden. Isoform 1 wurde bis zum DEAE-Sepharoseschritt zusammen mit Form 3b gereinigt. Sie verließ die DEAE-Säule mit dem 10 mM Waschpuffer, wurde anschließend an Calciumphosphat-Gel adsorbiert, schließlich in Detergens-freiem 0.3 M KPi/20% Glycerin auf ein möglichst kleines Volumen wieder desorbiert. In dieser Form wurde die Präparation in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80^oC für weitere Tests gelagert. Der spezifische Cytochrom-Gehalt von auf diese Weise gereinigten Präparationen lag regelmäßig über 15 nMol/mg; in der SDS-PAGE wurde nur eine einzige, etwas schneller als Form 2 laufende Bande erhalten (vgl. Abbildung 15).

c) Andere P-450 - Isoformen.

Die Reinigungsmethoden der folgenden, in dieser Arbeit für Vergleichszwecke benötigten Cytochrom P-450 - Isoformen entstammten folgenden Zitaten: Form 2 (74), Form 4 (69), Form 6 (81) und Form 3c (79).

3. Sonstige Enzyme und Proteine.

Art der Substanz	Herkunft	Anmerkung
NADPH-Cytochrom P-450 - Reduktase	Laborpräparat gem. (74). Eine Einheit der Aktivität (1 U) ist definiert als diejenige Menge Enzym, die in 1 Minute 1 µMol Cytochrom c in Gegenwart von NADPH reduziert. Die Spezifische Aktivität der Präparation lag bei 40 - 50 U/mg.	
Papain, Trypsin, Chymotrypsin	Sigma	
Cytochrom c (Pferdeherz, Typ III)	Sigma	
Krist. BSA (Fraktion V)	Sigma	
St. aureus V_8-Protease	Worthington	
COMT (Catechol-O-Methyl-Transferase, 6000 U/mg) aus Schweineleber	Calbiochem	

4. Substrate und Effektoren (ohne Radiochemikalien).

Art der Substanz	Herkunft	Anmerkung
Aminopyrin	Sigma	
7-Äthoxyresorufin	Pierce Chem. Co.	
Benzphetamin	Geschenk der Upjohn Chem. Co.	
Benz(a)pyren (gold label)	Aldrich Chem. Co.	
Biphenyl	Aldrich Chem. Co.	Vor Verwendung aus Petroläther umkrist.
3-Hydroxybenz(a)pyren	Geschenk von H.S. Gelboin, Nat. Cancer Inst. (USA)	
4-Hydroxybiphenyl	Aldrich Chem. Co.	Vor Verwendung aus Petroläther umkrist.
2-Hydroxyöstradiol	Sigma	
NADPH·Na_4 (Typ III)	Sigma	
17β-Östradiol	Sigma	
Resorufin	Pierce Chem. Co.	
Steroide (Substrate und Effektoren)	Sigma	

5. Radiochemikalien.

Art der Substanz	Herkunft	Anmerkungen
[^{3}H]-S-Adenosylmethionin (11.2 Ci/mMol)	NEN	
[4-^{14}C]-DOC (58 mCi/mMol)	Amersham	
[α-^{3}H]-Essigsäure (3.1 Ci/mMol)	Amersham	Wurde vor Verwendung mit nichtradioaktiver CH_3COOH auf 20 mCi/mMol verdünnt.
[4-^{14}C]-Progesteron (56 mCi/mMol)	Amersham	Zu über 99% radiochemisch rein (TLC + AR). Herstellung von Stammlösungen nach Verdampfen des Lösungsmittels unter N_2 von Versuch zu Versuch neu
[1.2.6.7.16.17.-^{3}H]-Progesteron (100 - 130 Ci/mMol)	Amersham	

6. Chromatographie- und Elektrophoresematerial.

Substanz	Herkunft	Anmerkungen
Acrylamid	BioRad	
Agarose	Sea Chem.	
Agarose-Hexan-(2.'5.'-ADP)	PL-Biochemicals	Verwendung zur Reinigung der P-450 - Reduktase
Ammoniumpersulfat	BioRad	
Bisacrylamid	BioRad	
Calciumphosphatgel	BioRad	
Carboxymethyl-Cellulose CM 52	Whatman	
DEAE-Cellulose DE 52	Whatman	
DEAE-Sepharose	Pharmacia	
Hydroxylapatit	BioRad	
Hydroxylapatit-Agarose	LKB	
Kieselgel 60-Dünnschicht-platten 250 µm (F_{254})	Baker (IB2-F)	
Phenyl-Sepharose	Pharmacia	
Reversed-phase Säule (µBondapak C_{18}) für HPLC	Waters	
SDS	BioRad	

7. Fein- und Biochemikalien.

Substanz	Herkunft	Anmerkungen
Comassie Brillant Blue	Sigma	
Chininsulfat	Sigma	0.1 N Lösung in H_2SO_4. Benutzung zur Kalibrierung der Hydroxylierung von Benz(a)pyren. Primärkalibrierung mit 3-Hydroxybenz(a)pyren.
Dilauroyl-L-a-Lecithin	Sigma	Herstellung der wässrigen Suspension durch Ultrabeschallung gem. (74) für jeden Versuch neu.
Dithioerythritol	Calbiochem	
DOC-Acetat	Serva	
Heparin	Universitätsapotheke Düsseldorf	
Natriumcholat	Aldrich Chem.Co.	Vor Verwendung aus Methanol umkristallisiert.
Nonidet P-40	Accurate Chem.Co.	
Polyäthylenglykol	Baker	Vor Verwendung Behandlung mit organ.Lösungsmitteln entsprechend (115).
N.N.N'.N'.-Tetramethylendiamin	BioRad	

8. Sonstige Chemikalien.

Alle anderen verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel entstammten üblichen kommerziellen Quellen in der höchsten,für den jeweiligen Verwendungszweck verfügbaren Reinheit. Lösungsmittel für die HPLC,einschließlich Wasser,waren Glas-destilliert und 1.5 µm - filtriert (Fa. Baker,Herstellerangaben).
Als Szintillations-Cocktails wurden'Econofluor'(Fa. New England Nuclear; wasserfreie Proben) und 'Miniria 20' (Koch-Light-Laboratories; wässrige Proben) verwendet.

III. ERGEBNISSE

A. Untersuchungen mit Mikrosomen

A.1 Schwankungsbreite und Korrelationen zwischen den Hydroxylierungen von Progesteron und Östradiol.

Aus den Ergebnissen der einleitenden Untersuchung (EINLEITUNG,I.7.) waren auf Seite 20 5 Fragen abgeleitet worden. Der erste Schritt zu ihrer Beantwortung bestand darin,zu überprüfen,wie sich hohe und niedrige Aktivitäten (Hydroxylierung von Progesteron und zusätzlich von Östradiol) unter 24 NZW-Kaninchen und 8 IIIVO/J-Kaninchen verteilten. Zu diesem Zweck wurden die mikrosomalen Präparationen der Einzeltiere in Gegenwart einer Enzym-sättigenden Substrat-Konzentration inkubiert und nach 2.5 - 5 Minuten 16α-,6ß- und 21-Hydroxyprogesteron quantifiziert.

Die auf mikrosomales Protein bzw. "Cytochrom P-450" bezogenen Aktivitäten enthalten die Tabellen 1a und 1b. Innerhalb aller getesteter Präparationen schwankt die 6ß-Hydroxylierung um einen Faktor von 15 (0.41 - 6.10 mU/mg) bzw. von 7 (0.41 - 2.94 mU/nMol P-450) ,die 16α-Hydroxylierung dagegen nur um die Faktoren 4 bzw. 3. Die größten Schwankungen sind bei der 21-Hydroxylierung von Progesteron mit Faktoren von ca. 85 (0.08 - 6.76 mU/mg) bzw. 67 (0.05 - 3.38 mU/nMol P-450) zu verzeichnen (Einzelwerte: Tab. 1a ; Mittelwerte: Tab.1b).

Die Schwankung der 2-Hydroxylierung von Östradiol innerhalb eines Faktors von 3 ist ähnlich gering wie diejenige der 16α-Hydroxylierung von Progesteron.

Der Mittelwert der 6ß-Hydroxylierung von Progesteron ist bei den IIIVO/J-Tieren nur etwa halb so groß wie bei den NZW-Tieren. Eine Korrelationsanalyse wurde nur für die NZW-Tiere durchgeführt. Sie zeigte überraschenderweise, daß sowohl die Schwankungen der 6ß- und der 16α-Hydroxylierung als auch diejenigen der Progesteron-21- und Östradiol-2-Hydroxylierung gut miteinander korrelieren (Abbildungen 6a und 6b). Die Korrelationskoeffizienten betragen r = 0.918 (Abb. 6a) und r = 0.864 (Abb. 6b).

Die 21-Hydroxylierung von Progesteron durch NZW-Mikrosomen korreliert dagegen weder mit dessen 16α- noch mit dessen 6ß-Hydroxylierung (Abbildung 7; nur 6ß-Hydroxylierung).

Dies waren die ersten, allerdings nicht zwingenden Hinweise darauf, daß

1) 16α- und 6ß-Hydroxylierung möglicherweise von derselben Isoform katalysiert werden;

Tier-Nummer	Geno-typ	Geschlecht 1)	P-450 - Gehalt [nMol/mg]	Hydroxylierung [mU/mg] von Progesteron in Position: 16α	6β	21	2-Hydroxy-lierung von Östradiol [mU/mg]	Klassifizierung 6β⁺/6β⁻	21h/21n
1	↑ NZW ("random bred")	m	1.24	1.21	2.22	0.27	n.d.	↑ 6β⁺	21n
2		w	2.11	0.46	0.73	0.39	n.d.		21n
3		w	1.91	1.28	2.36	0.21	n.d.		21n
4		w	1.80	0.63	0.96	0.30	n.d.		21n
5		w	2.37	1.32	2.78	3.69	n.d.		21h
6		w	2.33	0.58	0.83	3.29	n.d.		21h
7		m	2.24	1.43	3.28	2.76	2.50		21h
8		w	1.77	1.73	3.93	0.18	1.20		21n
9		m	1.57	1.29	3.03	0.32	n.d.		21n
10		w	2.06	1.92	6.10	4.83	2.80		21h
11		w	2.03	1.30	2.48	0.51	n.d.		21n
12		m	2.03	1.15	2.84	2.23	1.31		21h
13		m	2.14	1.76	3.86	0.68	n.d.		21n
14		m	1.55	1.06	1.45	0.10	n.d.		21n
15		m	1.28	0.75	1.07	0.20	n.d.		21n
16		m	1.87	1.34	3.05	0.51	1.86		21n
17		m	1.60	0.89	1.23	0.08	1.08		21n
18		w	2.00	1.60	3.91	6.76	3.54		21h
19		w	2.56	2.00	4.32	4.24	n.d.		21h
20		m	1.80	2.14	4.14	0.86	0.99		21n
21		m	2.40	2.06	5.04	0.37	1.31		21n
22		w	2.50	1.75	5.31	2.80	3.17		21h
23		m	2.60	1.63	3.18	0.56	n.d.		21n
24	↓	w	1.26	1.14	1.26	0.44	n.d.	↓	21n
25	IIIVO/J ("inbred")	w	1.80	1.03	1.34	0.20	n.d.	↑ 6β⁻	21n
26		m	1.63	0.99	0.74	0.47	n.d.		21n
27		m	1.00	0.54	0.41	0.13	n.d.		21n
28		m	1.14	0.59	0.38	0.13	n.d.		21n
29		m	1.70	1.16	2.45	0.45	n.d.		21n
30		m	2.03	0.91	1.70	0.22	n.d.		21n
31		m	1.55	1.04	2.64	0.29	n.d.		21n
32		m	2.54	0.97	1.47	0.34	n.d.	↓	21n

1) m = männlich; w = weiblich.

TABELLE 1a: Hydroxylierung von Progesteron und Östradiol in Gegenwart von Mikrosomen aus Lebern einzelner Kaninchen und NADPH (Einpunkt-messungen bei Substrat-Sättigung). 30 µg mikrosomales Protein wurden in Gegenwart von 10 nMol [^{14}C]-Progesteron oder 10 nMol Östradiol 2.5 bis 5 Minuten lang bei 37°C in einem Endvolumen von V_t = 1 mL inkubiert. Einzelheiten der Inkubation sowie der Aufarbeitung der Metabolite s. "Methoden" (S.22 ff.).

Die Begründung der Klassifizierung der Einzeltiere nach "21h/21n" bzw. "6β⁺/6β⁻" (rechte Spalte) ist Gegenstand der folgenden Abschnitte III.A.2.1. (S.43 ff.) und III.A.2.2.1. (S.45 ff.).

Tier-Nummern	Genotyp	Aktivitätseinheit	Hydroxylierung von Progesteron in Position: 16α	6β	21	2-Hydroxylierung von Östradiol
1 - 24	NZW ("random bred")	[mU/mg]	1.35 ± 0.46	2.89 ± 1.47	3.83 ± 1.36 (21h; n = 8) / 0.37 ± 0.21[1] (21n; n = 15)	2.06 ± 0.84 (n = 10)
		[$\frac{mU}{nMol\ P\text{-}450}$]	0.70 ± 0.23	1.47 ± 0.66	1.73 ± 0.73 (21h; n = 8) / 0.21 ± 0.12[1] (21n; n = 15)	1.00 ± 0.37 (n = 10)
25 - 32	IIIVO/J ("inbred")	[mU/mg]	0.90 ± 0.21	1.39 ± 0.81	0.28 ± 0.12	n.d.
		[$\frac{mU}{nMol\ P\text{-}450}$]	0.55 ± 0.10	0.81 ± 0.47	0.17 ± 0.07	n.d.

[1] Ohne Einbeziehung von Tier Nr. 24 (vgl. Text S. 53).

TABELLE 1b: Hydroxylierung von Progesteron und Östradiol in Gegenwart von Mikrosomen aus Lebern einzelner Kaninchen und NADPH (Mittelwerte der Einpunktmessungen aus Tab. 1a; nähere Erläuterungen s. dort).

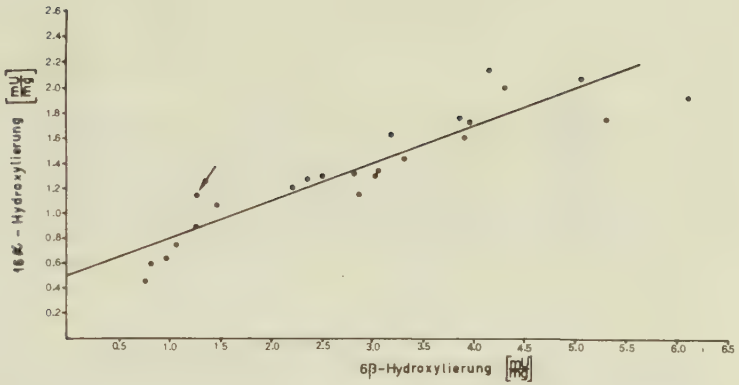


ABBILDUNG 6a: Korrelation der mikrosomalen 6ß- und 16α-Hydroxylierung von Progesteron unter 24 NZW-Kaninchen. Beide Aktivitäten korrelieren mit r = 0.918. Der durch den Pfeil herausgehobene Meßpunkt stammt von NZW-Präparation Nr. 24 ($6\beta^-$). Alle anderen Präparationen aus NZW-Tieren waren $6\beta^+$ (vgl. Tab.1a; dort auch experimentelle Einzelheiten).

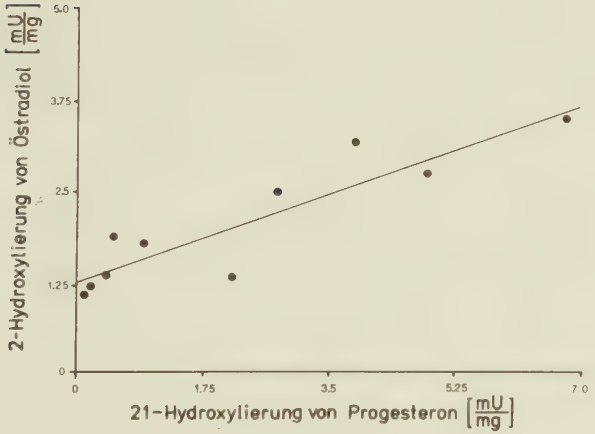


ABBILDUNG 6b: Korrelation der mikrosomalen 21-Hydroxylierung von Progesteron und der 2-Hydroxylierung von Östradiol unter 10 NZW-Kaninchen. Beide Aktivitäten korrelieren mit r = 0.864. Experimentelle Einzelheiten bei Tab. 1a.

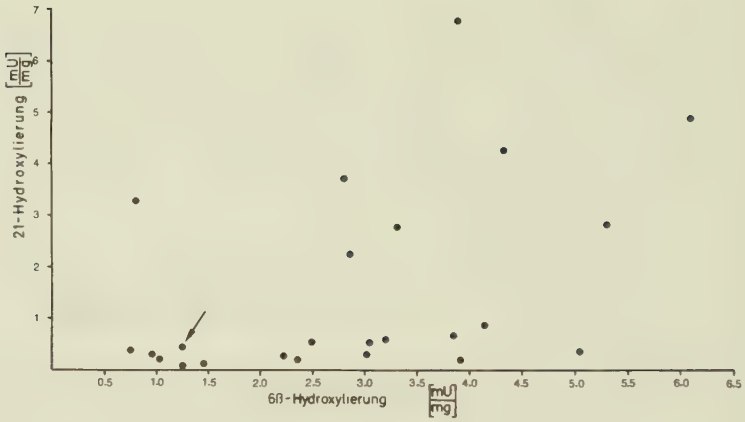


ABBILDUNG 7: Überprüfung der Korrelation von mikrosomaler 6ß- und 21-Hydroxylierung von Progesteron unter 24 NZW-Kaninchen. Die Aktivitäten korrelieren nicht. Weitere Erläuterungen wie bei Abb.6a.

2) diese Isoform(en) nicht identisch ist (sind) mit der 21-Hydroxylase von Progesteron, und
3) dieselbe Isoform, die Progesteron in 21-Stellung hydroxyliert, auch Östradiol in 2-Stellung hydroxyliert.

Der Gehalt aller untersuchten mikrosomalen Präparationen an "Cytochrom P-450" schwankte zwischen 1 und 3 nMol/mg. Zwischen diesem Parameter und den gemessenen Aktivitäten wurden keine Korrelationen gefunden. Die (endogenen) Faktoren, welche über die Höhe dieser einzelnen Aktivitäten bestimmen, konnten also nicht mit denjenigen identisch sein, die die Expression des "Cytochrom P-450" in Mikrosomen insgesamt steuern.

A.2. Enzymkinetische Beschreibung der mikrosomalen Progesteron-Hydroxylierungen.

Der nächste Schritt hatte zum Ziel, die Art der Steuerung aller drei Progesteron-Hydroxylierungen auf der mikrosomalen Ebene in enzymkinetischen Quantitäten auszudrücken. Die 2-Hydroxylierung von Östradiol blieb ausgespart, weil im Rahmen dieser Arbeit die Verwendbarkeit des eingesetzten 2-stufigen Tests für enzymkinetische Studien nicht geklärt werden konnte.

A.2.1. 21-Hydroxylierung von Progesteron.

Zunächst wurde untersucht, ob die unterschiedlichen DOC-Bildungsraten aus Tab.1a/b auf die Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen eines endogenen, reversibel bindenden Aktivators oder Hemmstoffs oder auch auf unterschiedliche Sekundärmetabolismusraten des aus Progesteron gebildeten DOC zurückführbar waren. Hierzu wurden gleiche Proteinmengen von Mikrosomen mit hoher und niedriger 21-Hydroxylase-Aktivität zur Bestimmung der Misch-Aktivität koinkubiert.

Das Ergebnis zeigt Tabelle 2. Die erhaltenen Aktivitäten setzen sich bei beiden Substrat-Konzentrationen additiv aus den erwarteten Anteilen der Einzelaktivitäten zusammen. Dieser Befund ist nur mit der Annahme erklärbar, daß keine der beiden Präparationen Faktoren enthält, welche die eigene oder die Aktivität der anderen Präparationen hemmen oder aktivieren. Für den Fall eines erhöhten DOC-Sekundärmetabolismus oder eines Inhibitors in Mikrosomen mit der niedrigen Progesteron-21-Hydroxylierung hätte die additive Rate zumindest bei der niedrigen Substrat-Konzentration deutlich unterschritten, im Fall der Anwesenheit eines Aktivators in den Mikrosomen mit der hohen DOC-Bildungsrate jedoch deutlich überschritten werden müssen.

Mikrosomen aus Tier Nr.	Proteinmenge in 1 ml	Progesteron -Konzentr.	21-Hydroxylierung [mU/mg] erwartet[1)]	gemessen
NZW 24	30 µg	13 µM	---	0.42
NZW 10	30 µg	13 µM	---	5.1
Mischung:				
NZW 24 + NZW 10	60 µg	13 µM	2.76 = ca.	2.64
NZW 24	30 µg	2.22 µM	---	0.297
NZW 10	30 µg	2.22 µM	---	3.69
Mischung:				
NZW 24 + NZW 10	60 µg	2.22 µM	1.99 = ca.	2.18

1) Werte aus Tabelle 1a hier nicht verwendbar wg. veränderter Substratkonzentration.

TABELLE 2: Additivität von "hoher" und "niedriger" mikrosomaler Progesteron-21-Hydroxylierung. Gleiche Mengen unterschiedlich aktiver mikrosomaler Präparationen aus Lebern von Einzeltieren wurden gemeinsam und getrennt 5 Minuten bei 37°C in Gegenwart von NADPH und Substrat (Progesteron) inkubiert. Quantifizierung des Metaboliten 21-Hydroxyprogesteron in "Methoden" (S.22 ff.)

Zur enzymkinetischen Analyse wurde die Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Bildung von DOC aus Progesteron von der Substrat-Konzentration an mehreren Mikrosomen-Präparationen mit hoher und niedriger 21-Hydroxylase-Aktivität (Tab. 1a) bestimmt. Für 4 repräsentative Präparationen sind die Meßpunkte in Abbildung 8 doppelt reziprok aufgetragen. Alle Präparationen ließen sich durch apparente Km-Werte um 2 µM charakterisieren. Ähnlich den in Tab. 1a wiedergegebenen Einpunktmessungen (Substratsättigung) variieren die Vmax-Werte von Abb.8 jedoch ganz erheblich zwischen 0.17 ("21-OH niedrig") und 2.5 mU/nMol P-450 ("21-OH hoch"). Nur bei ersteren wird bei den höchsten Substrat-Konzentrationen noch eine zweite, niederaffine kinetische Phase sichtbar.

Alle IIIVO/J-Mikrosomen waren als "21-OH niedrig" einzustufen. Die statistische Beschreibung der NZW-Tiere in "21-OH hoch" und "21-OH niedrig" folgt in III.A.3.2. Im Sinne einer kürzeren Schreibweise wird im folgenden für "21-OH niedrig" 21n, für "21-OH hoch" dagegen 21h geschrieben.

A.2.2. 6β- und 16α-Hydroxylierung von Progesteron.

Ähnlich wie in A.2.1. wurde auch hier zunächst untersucht, ob die beobachteten mikrosomalen Unterschiede in der Bildungsrate von 6β- und 16α-Hydroxyprogesteron (vgl. Tabelle 1a) eventuell auf die Anwesenheit eines reversibel bindenden endogenen Aktivators oder Inhibitors zurückgeführt werden konnten.

Die Mischaktivitäten gleicher Proteinmengen aus Mikrosomen unterschiedlicher Aktivität zeigt Tabelle 3. Bei beiden Substrat-Konzentrationen setzen sie sich streng additiv aus den gemessenen Einzelaktivitäten zusammen. Die Interpretation dieses Ergebnisses ist genau dieselbe wie in A.2.1. (s. dort).

Die enzymkinetische Untersuchung der simultan ablaufenden mikrosomalen 6β- und 16α-Hydroxylierung von Progesteron lieferte ein qualitativ völlig anderes Bild als die 21-Hydroxylierung.

A.2.2.1. 6β-Hydroxylierung von Progesteron.

Wie Abbildung 9 zeigt, beruhen die Schwankungen in der 6β-Hydroxylierung (vgl. Tabelle 1a im wesentlichen nicht auf unterschiedlichen Vmax-, sondern auf Schwankungen der mikrosomalen Km-Werte. Die resultierende Einteilung der Mikrosomen bedurfte keiner statistischen Beschreibung. Mit einer einzigen Ausnahme - Nr. 24 in Tabelle 1 - wurde für diese Hydroxylierung an allen NZW-Mikrosomen eine apparente Km von ca. 4 µM gemessen. Alle IIIVO/J-Präparationen und NZW-Präparation Nr. 24

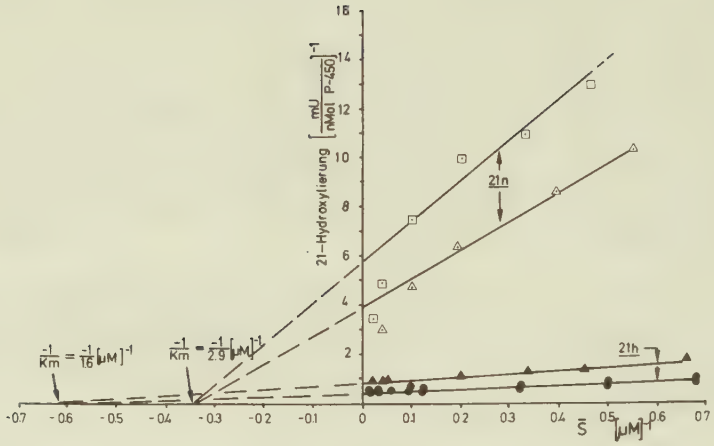


ABBILDUNG 8: 21-Hydroxylierung von Progesteron in Gegenwart mikrosomaler Präparationen aus Lebern einzelner NZW- oder IIIVO/J-Kaninchen und NADPH. Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Substrat-Konzentration (Auftragung n. Lineweaver-Burk).

21h: 2 Präparationen mit "hoher" Vmax (geschlossene Symbole; NZW-Tiere)

21n: 2 Präparationen mit "niedriger" Vmax (offene Symbole; ein NZW-Tier (◻) und ein IIIVO/J-Tier (△)).

Mikrosomen aus Tier Nr.	Proteinmenge in 1 ml	Progesteron-Konzentr.	Hydroxylierung in Position 16α erwartet[1]	16α gemessen	6β erwartet[1]	6β gemessen
NZW 24	30 µg	13 µM	---	1.34	---	2.16
NZW 10	30 µg	13 µM	---	2.28	---	6.79
Mischung:						
NZW 24 + NZW 10	60 µg	13 µM	1.81 = ca.	1.72	4.48 = ca.	4.12
NZW 24	30 µg	2.22 µM	---	0.52	---	0.36
NZW 10	30 µg	2.22 µM	---	0.76	---	2.76
Mischung:						
NZW 24 + NZW 10	60 µg	2.22 µg	0.64 =	0.64	1.56 = ca.	1.55

[1] Werte aus Tabelle 1a hier nicht verwendbar wg. veränderter Substratkonzentration.

TABELLE 3: Additivität von "hoher" und "niedriger" mikrosomaler Progesteron-16α- und 6β-Hydroxylierung. Erläuterung vgl. Tabelle 2

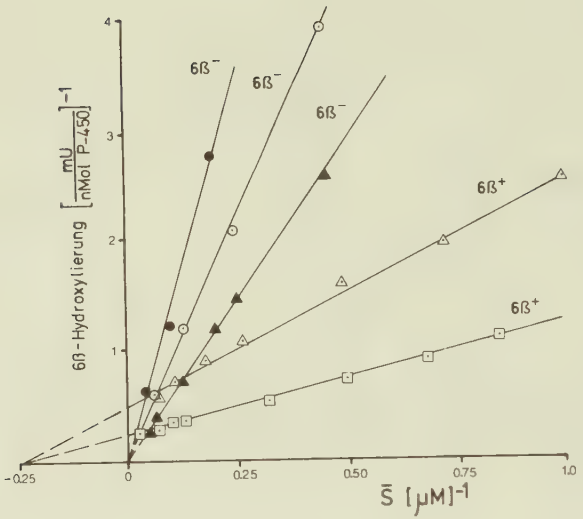


ABBILDUNG 9: 6ß-Hydroxylierung von Progesteron in Gegenwart mikrosomaler Präparationen aus Lebern einzelner Kaninchen (NZW oder IIIVO/J) und NADPH. Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Substrat-Konzentration (Auftragung n. Lineweaver-Burk).

$6ß^+$, offene Symbole: 2 beispielhafte NZW-Präparationen (für 23 von 24 Tieren) mit niedriger apparenter Km (ca. 4 µM).

$6ß^-$, offene Symbole: Einzige NZW-Präparation (Nr. 24 in Tab.1a) mit hoher apparenter Km (> 60 µM, vgl. Text S. 49, 1. Absatz; die Extrapolation auf den Ursprung des Koordinatensystems ist enzymkinetisch nicht interpretierbar)-

$6ß^-$, geschlossene Symbole: 2 beispielhafte Präparationen für alle IIIVO/J-Tiere (8 von 8 Tieren); hohe apparente Km (> 60 µM, vgl. vorstehende Erläuterung und Text S. 49, 1. Absatz).

in Tabelle 1a weisen dagegen eine Km von über 60 µM für diese Reaktion auf.

Obwohl von den Meßwerten her anscheinend berechtigt, wäre es wenig sinnvoll gewesen, für diese Km einen höheren Wert anzugeben, da die Konzentration von 60 µM auch die Löslichkeitsgrenze von Progesteron in wässrigen Lösungen darstellt (98).

Der Vergleich der Lineweaver-Burk - Auftragungen aus Abbildung 8 und 9 läßt auch erkennen, warum trotz der großen Km-Unterschiede die Einpunkt-Messungen von Tabelle 1a im Fall der 6β-Hydroxylierung wesentlich weniger unterschiedliche Werte geliefert haben als im Fall der 21-Hydroxylierung: Nur Mikrosomen mit niedrigen (hohen) Vmax-Werten haben jetzt den niedrigen (hohen) Km-Wert. Deshalb variiert das Geschwindigkeits-bestimmende Vmax/Km - Verhältnis (Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung;(97)) bei der Umsetzung von Progesteron zu DOC, wo ja nur Vmax veränderlich war, wesentlich stärker als bei der Progesteron-6β-Hydroxylierung.

Mikrosomen mit der niedrigen apparenten Km für die 6β-Hydroxylierung werden im folgenden als $6\beta^+$-Mikrosomen, diejenigen mit der hohen Km (über 60 µM) als $6\beta^-$-Mikrosomen bezeichnet.

A.2.2.2. 16α-Hydroxylierung von Progesteron.

Messungen mit dem Ziel, $6\beta^+$- und $6\beta^-$-Mikrosomen auch hinsichtlich ihrer kinetischen Parameter für die 16α-Hydroxylierung zu unterscheiden, schlugen fehl. In der Auftragung nach Lineweaver-Burk lieferten alle NZW- und IIIVO/J-Präparationen (Abbildung 10) jedoch zwei Phasen. Die "hochaffine Phase" ist durch einen Km-Wert von ca. 8 µM gekennzeichnet, wogegen der Km-Wert für die "niederaffine Phase" wie im Fall der 6β-Hydroxylierung über 60 µM liegen muß.

Dieses Ergebnis war überraschend, da ja von der guten Korrelation zwischen beiden Hydroxylierungen (Abbildung 6a) auf deren Katalyse durch dieselbe P-450 - Isoform geschlossen worden war (s.S. 38). Sollte diese Annahme weiterhin zutreffen, so mußte davon ausgegangen werden, daß in NZW- und IIIVO/J-Mikrosomen mehrere P-450 - Isoformen mit der Fähigkeit der "hochaffinen" 16α-Hydroxylierung vorlagen, die aus Abbildung 10 abzuleitende Einteilung in "hoch"- und "nieder" affine 16α-hydroxylierende Phase bzw. P-450 - Isoform für den Zweck dieser Untersuchung demnach nicht interpretierbar war.

Desto beachtenswerter war bezüglich der 6β-Hydroxylierung (A.2.2.1.) die Tatsache, daß die Meßdaten aus Abbildung 9 die funktionelle Klassifizierung von Mikrosomen

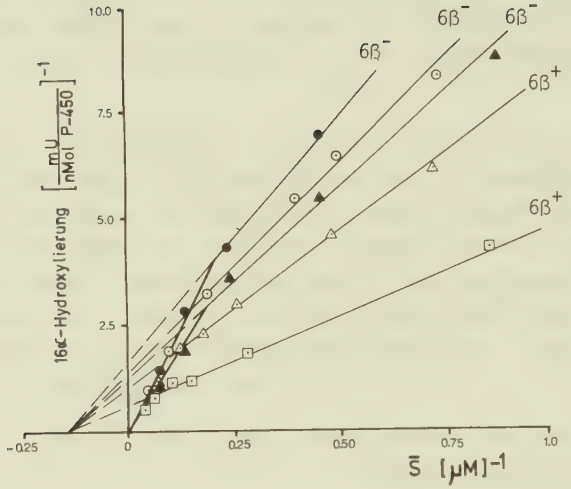


ABBILDUNG 10: 16α-Hydroxylierung von Progesteron in Gegenwart mikrosomaler Präparationen aus Lebern einzelner Kaninchen (NZW oder IIIVO/J) und NADPH.

Alle weiteren Erläuterungen wie in Abb.9, Seite 48. Im Gegensatz zu Abb.9 sind jetzt bei allen Präparationen (NZW oder IIIVO/J) zwei enzymkinetische Phasen mit deutlich unterscheidbaren (apparenten) Km- und Vmax-Werten zu beobachten.

Hochaffine Phase: Km (app.) = ca. 8 μM.
Niederaffine Phase: vgl. Kommentar zur Km der 6β$^-$-Präparationen bei Abb.9.

mit Hilfe einer einfachen Entscheidung (6β$^+$ oder 6β$^-$) ermöglichten.

A.3. Verteilung hoher und niedriger Aktivitäten unter NZW-Mikrosomen.

Im vorhergehenden Abschnitt (A.2.) war es auf der mikrosomalen Ebene gelungen, die unterschiedlichen Progesteron-Hydroxylierungsraten aus Tabelle 1a durch Bestimmung der zugehörigen apparenten Km- und Vmax-Werte auf enzymkinetische Quantitäten zurückzuführen.

Es war nun von Interesse, diese Einpunkt-Messungen unter dem Blickwinkel ihrer mikrosomalen Herkunft (21h oder 21n, bzw. 6β$^+$ oder 6β$^-$) statistisch zu ordnen, um daraus eventuell eine Aussage über die Modalität ihrer Verteilung unter NZW-Kaninchen zu gewinnen.

A.3.1. 6β- und 16α-Hydroxylierung von Progesteron.

Die Einpunkt-Messungen dieser beiden Aktivitäten sind für NZW-Kaninchen monomodal um Mittelwerte von 2.89 $\pm$ 1.47 mU/mg (6β-Hydroxylierung) bzw. von 1.35 $\pm$ 0.46mU/mg (16α-Hydroxylierung) verteilt. Abbildung 11 zeigt dies für die 6β-Hydroxylierung. Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß die Lokalisierung einer NZW-Präparation innerhalb dieser monomodalen Verteilung nichts darüber aussagt, ob sie dem Typ 6β$^+$ oder 6β$^-$ zuzuordnen ist.

Der im Vergleich zu NZW-Mikrosomen niedrigere Mittelwert in IIIVO/J-Mikrosomen für die 6β-Hydroxylierung (1.39 $\pm$ 0.81 mU/mg; vgl. Tabelle 1b) ist eine Folge von deren höherem Km-Wert. Der Unterschied ist wegen der breiten Streuung der Einpunkt-Messungen in beiden Tiergruppen nicht signifikant, könnte jedoch mit der geringen Häufigkeit (1/24) erklärt werden, mit der 6β$^-$-Mikrosomen aus NZW-Tieren offenbar erhalten werden.

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, zur statistischen Beschreibung dieser Häufigkeit eine genügend große Zahl von Kaninchenlebern aufzuarbeiten. Außerdem hätten zu diesem Zweck die enzymkinetischen Parameter der mikrosomalen Progesteron-6β-Hydroxylierung in jedem einzelnen Fall bestimmt werden müssen. Dies erschien überflüssig. Entscheidend war vielmehr, daß zur Aufdeckung der biochemischen Grundlage dieses funktionellen Polymorphismus des "Cytochrom P-450" auf die IIIVO/J-Tiere zurückgegriffen werden konnte. Sie zeigten die 6β$^-$-Abweichung stetig.

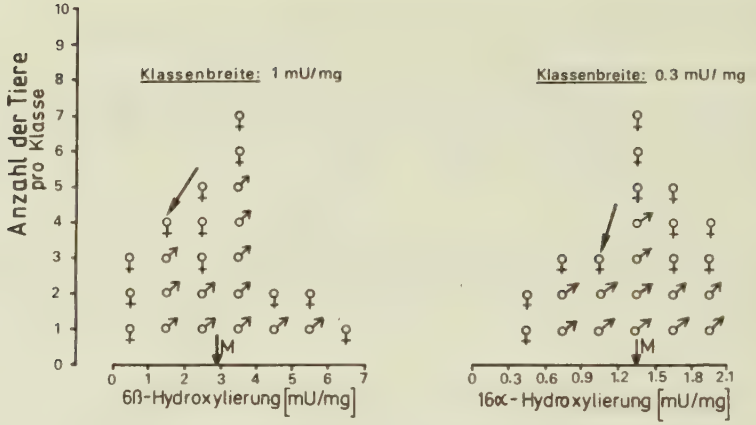


ABBILDUNG 11: Histogramme zur Verteilung der mikrosomalen 6ß- und 16α-Hydroxylierung von Progesteron unter NZW-Kaninchen 1 - 24 (vgl. Tab.1a). Die durch den Pfeil hervorgehobenen Eintragungen stammen von Tier Nr. 24 ($6ß^-$). Alle anderen NZW-Tiere waren $6ß^+$.

M = Mittelwerte (Tab. 1b).

A.3.2. 21-Hydroxylierung von Progesteron und 2-Hydroxylierung von Östradiol.

Im Gegensatz zur 6ß- und 16α-Hydroxylierung von Progesteron sind die Anfangsgeschwindigkeiten seiner Umsetzung zu DOC durch Mikrosomen innerhalb der untersuchten NZW-Population bimodal verteilt (Abbildung 12). Aktivitäten zwischen 0.18 und 6.8 mU/mg wurden gemessen (Tabelle 1a). Mikrosomen aus acht der aufgeführten 23 NZW-Tiere sind einem Mittelwert von 3.83 ± 1.6 mU/mg zuzuordnen (21h), während die übrigen 15 sich um einen Mittelwert von 0.37 ± 0.21 mU/mg gruppieren (21n). Dagegen ist die Östradiol-2-hydroxylierende Aktivität trotz ihrer guten Korrelation mit der 21-Hydroxylierung von Progesteron (Abb.6b) in NZW-Mikrosomen nicht bimodal verteilt (o.Abb.). Dieser Beobachtung liegen die im Vergleich zur 21-Hydroxylierung von Progesteron höheren Basalwerte von 21n-Mikrosomen bezüglich der Östradiol-2-Hydroxylierung zugrunde.

Es läßt sich berechnen, daß die anteilige Umwandlung von Progesteron in DOC bei den 21h-Tieren zu ca. 0.33% erfolgte, gegenüber 0.03% bei den 21n-Tieren (o.Abb.). Daraus folgt, daß man es bei den 21h-Mikrosomen nicht mit einer unspezifischen Erhöhung aller hydroxylierenden mikrosomalen Aktivitäten zu tun hat. Die Unterscheidung um einen Faktor von 10 ist zudem wesentlich größer als routinegemäß für andere Aktivitäten nach Behandlung von Versuchstieren mit klassischen Induktoren des "Cytochrom P-450" zu beobachten ist. Dennoch unterschieden sich 21h- und 21n-Mikrosomen weder hinsichtlich ihres Gehaltes an "Cytochrom P-450", noch bezüglich ihres nach Auftrennung durch SDS-PAGE bei Molekulargewichten um 50000 erhaltenen Peptidmusters.

Männliche und weibliche Tiere sind in beiden Gruppen vertreten (vgl. linke und rechte Hälfte von Abb. 13). Die hohe Aktivität wurde für Mikrosomen aus weiblichen Tieren häufiger beobachtet (6/11) als für solche aus männlichen Tieren (2/12), doch kann dieser Unterschied wegen der geringen Anzahl zu erwartender 21h-Tiere nicht als statistisch signifikant bezeichnet werden. Die Wahrscheinlichkeit, daß der gefundene Geschlechtsunterschied nur ein Zufallsergebnis ist, liegt jedoch unter 20% ($\chi^2 = 2.2$).

B. In vivo-Untersuchung der Progesteron-21-Hydroxylierung.

In einer in vivo-Studie wurden bezüglich der Verabreichung von Progesteron im Plasma steady-state - Bedingungen durch kontinuierliche Infusion hergestellt. Das während der Dauer des Zutreffens dieser Bedingungen im Plasma vorhandene DOC wurde isoliert und daraufhin untersucht, wie hoch in ihm der Anteil an [^{3}H]-DOC war, der aus dem infundierten [^{3}H]-Progesteron durch 21-Hydroxylierung während der Infusionsperiode gebildet worden sein mußte. Als Parameter diente der Quotient

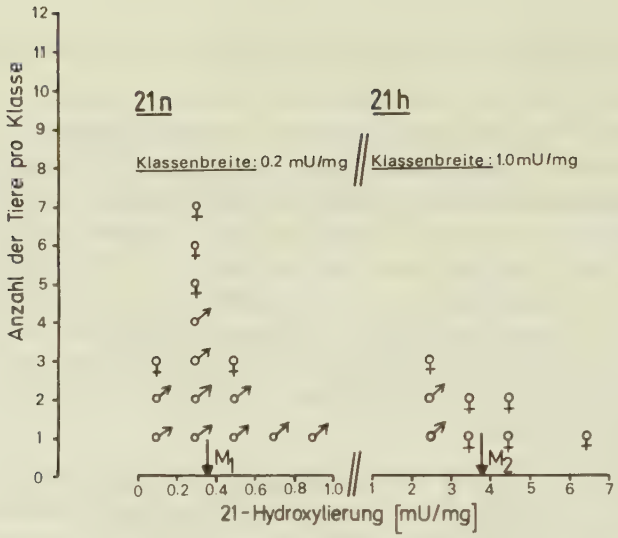


ABBILDUNG 12: Histogramm zur Verteilung der mikrosomalen 21-Hydroxylierung von Progesteron unter NZW-Kaninchen 1 - 23 (vgl. Tab.1a).
M_1,M_2: Mittelwerte der Untergruppen 21n bzw. 21h (vgl.Tab.1b).

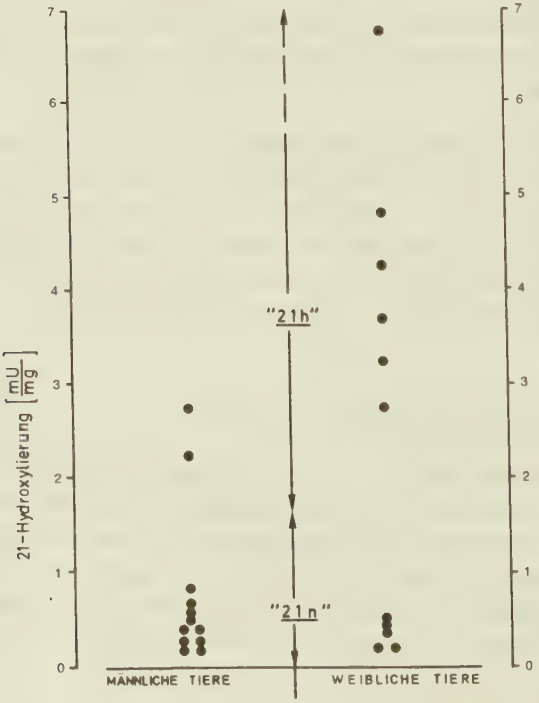


ABBILDUNG 13 :
Verteilung der mikrosomalen 21-Hydroxylierung von Progesteron unter männlichen (12) und weiblichen (11) NZW-Kaninchen (Streudiagramm). Experimentelle Einzelheiten s. "Methoden" und Tab. 1a.

Tier-Nummer[1)]	Q(P ⟶ DOC) (Metabolisches Verhältnis von [^{3}H]DOC zu [^{3}H]P im Plasma)		Zugehörige Aktivität der mikrosomalen Progesteron-21-Hydroxylierung [mU/nMol P-450]	
	1.Bestimmung	2.Bestimmung		
3123	$8 \cdot 10^{-3}$	$1.6 \cdot 10^{-3}$	0.079	(21n)
3125	$5.6 \cdot 10^{-3}$	$13.5 \cdot 10^{-3}$	0.090	"
3126	$0.25 \cdot 10^{-3}$	$1.48 \cdot 10^{-3}$	0.051	"
3127	$3.1 \cdot 10^{-3}$	$0.45 \cdot 10^{-3}$	0.092	"
3128	$2.8 \cdot 10^{-3}$	$1.6 \cdot 10^{-3}$	0.557	(21h)
3188	$6.8 \cdot 10^{-3}$	$11.8 \cdot 10^{-3}$	0.048	(21n)
3191	$4.73 \cdot 10^{-3}$	$8.43 \cdot 10^{-3}$	n.d.	
3192	$4.65 \cdot 10^{-3}$	$8.36 \cdot 10^{-3}$	n.d.	

1) Tiere und Meßwerte dieser Tabelle entstammten einer anderen Versuchsreihe als die Tabellen 1a/b.

TABELLE 4: In vivo - Bildung von [1.2.6.7.16.17.(n)-^{3}H]-DOC aus [1.2.6.7.16.17.(n)-^{3}H]-Progesteron und mikrosomale Progesteron-21-Hydroxylase Aktivität in NZW-Kaninchen. Das metabolische Verhältnis von [^{3}H]DOC zu [^{3}H]-Progesteron wurde im Abstand von 4-6 Wochen insgesamt zweimal am selben Tier bestimmt,danach die Mikrosomen präpariert und in ihnen die Bildungsrate von DOC aus Progesteron gemessen. Experimentelle Einzelheiten s. "Methoden".

Vgl. Text S. 56

$$Q = \frac{\text{DOC aus infundiertem Progesteron (P}\rightarrow\text{DOC)}}{\text{gesamte infundierte Progesteron-Menge (P)}}.$$

Dieses Verhältnis wird nachstehend als die Größe Q(P→DOC) bezeichnet, der Nenner P des Quotienten also der Einfachheit halber weggelassen.

Hinsichtlich der Versuchsergebnisse war die Erwartung berechtigt, eine Reihe von Einzeltieren zunächst durch einen hohen oder niedrigen Quotienten charakterisieren zu können, um so die Feststellung ihres metabolischen Status (21h oder 21n) bereits in vivo zu ermöglichen. Danach hätte Aussicht bestanden, durch gezielte Eingriffe in diesen Status dessen Regulation unter in vivo-Bedingungen studieren zu können.

Die Versuche zur Bestimmung von Q(P→DOC) zeitigten nicht das erwartete Ergebnis. Es wurden zwar verschieden hohe, doch für ein- und dasselbe Tier nicht immer dieselben Werte erhalten. (Tabelle 4). Die Möglichkeit, daß der metabolische Status der 21-Hydroxylierung von Progesteron kurzfristigen Änderungen unterworfen ist, die sich der reproduzierbaren Erfassung durch die gewählte Versuchsanordnung entziehen, war nicht auszuschließen. Nach der Aufarbeitung wiesen die Mikrosomen nur eines von 7 männlichen Tieren den 21h-Status auf.

C. Substrat-Spezifität elektrophoretischer P-450 - Isoformen.

C.1. Qualitative Zuordnungen (Einpunkt-Messungen).

Die in Tabelle 1a dargestellten und in Abschnitt A. auf der mikrosomalen Ebene näher untersuchten funktionellen Aktivitätsschwankungen bedurften einer Beschreibung oder Erklärung auf dem nächst niederen Organisationsniveau der Zelle, also der Ebene der strukturellen Multiplizität des mikrosomalen "Cytochrom P-450". Es lag deshalb nahe, im nächsten Untersuchungsschritt zu fragen, ob eine oder mehrere der bereits bekannten und elektrophoretisch einheitlich dargestellten P-450 - Isoformen aus Kaninchenmikrosomen diese Reaktionen im Rekonstituierten System katalysierten. In Schwankungen des mengenmäßigen Vorkommens dieser Formen oder überhaupt ihrer An- oder Abwesenheit war nämlich eine denkbare biochemische Basis für die Beobachtungen an Mikrosomen zu sehen.

Die orientierenden Vortests erwiesen, daß Form 3b aus NZW-Kaninchen, wie sie von Johnson 1980 beschrieben worden war (81), besonders gut die Hydroxylierung von Progesteron in 6β- und 16α-Stellung katalysierte. Der naheliegende Schluß jedoch, 6β⁻-Mikrosomen (s.S.49) enthielten diese P-450 - Isoform nicht, erwies sich als nicht berechtigt.

Form 3b ließ sich aus IIIVO/J-Mikrosomen und aus NZW-Präparation Nr.24 in gleicher Ausbeute und Reinheit isolieren wie aus den übrigen 23 NZW-Präparationen (s.S. 61). Im Gegensatz zur "NZW-Form 3b" ist sie in der folgenden Tabelle 5 als "IIIVO/J-Form 3b" aufgeführt.

Tabelle 5 zeigt die Steroid-hydroxylierenden Aktivitäten der wichtigsten der zur Zeit verfügbaren P-450 - Isoformen aus Kaninchenleber gegenüber Progesteron und Östradiol. Bezüglich der Formen 1 und 3b handelte es sich um Messungen bei Substratsättigung. Es fällt auf, daß die drei "induzierbaren" Formen 2,4 und 6 die geringsten, die quantitiv bedeutendsten "konstitutiven" Formen 1 und 3b dagegen die höchsten Aktivitäten besitzen. Die Umsatzrate von Form 1 beträgt 5.8 mU/nMol P-450 für die Progesteron-21-Hydroxylierung, ein über 30-mal höherer Wert als ihn irgendeine der anderen Isoformen aufweist. Fast ebenso ausgeprägt ist die Spezifität der Umsetzung von Östradiol zu 2-Hydroxyöstradiol durch diese P-450 - Isoform.

Form 3b aus NZW-Kaninchen ($6\beta^+$-Mikrosomen) dagegen katalysiert besonders gut die beiden anderen Progesteron-Hydroxylierungen. Überraschend ist die Beobachtung, daß IIIVO/J-Form 3b bei denselben Substrat-Konzentrationen, wo NZW-Form 3b beide Hydroxylierungen sehr gut und im Vergleich zu den andern Formen auch spezifisch katalysiert, fast keine 6ß-hydroxylierende Aktivität gegenüber dem Substrat Progesteron besitzt. Das Verhalten dieser Isoform steht also in genauer Übereinstimmung mit den Befunden an denjenigen Mikrosomen von Einzeltieren, aus denen diese Form 3b isoliert worden war. Genau dieselbe Übereinstimmung wurde auch für die aus NZW-Tier Nr. 24 (Tabelle 1a) isolierte Form 3b erhalten.

Beide Form 3b-Varianten werden, in Anlehnung an die Unterscheidung der Mikrosomen (III.A.2.2., letzter Absatz) von jetzt ab als $6\beta^+$-Form 3b und $6\beta^-$-Form 3b bezeichnet. Besser als die Unterscheidung nach NZW- oder IIIVO/J-Tieren trägt diese Benennung der Tatsache Rechnung, daß im Rahmen dieser Arbeit eine $6\beta^-$-Form 3b auch aus einem NZW- oder "random bred"-Kaninchen isoliert werden konnte.

Bei der höheren Substrat-Konzentration von Tabelle 5 nimmt die 6ß-Hydroxylierungsrate von Progesteron nur in Gegenwart von Form 2, $6\beta^-$-Form 3b und Form 6 zu. Dies läßt vermuten, daß die entsprechenden Km-Werte wesentlich höher liegen als für $6\beta^+$-Form 3b, die Umsetzung von Progesteron zur 6ß-Hydroxyverbindung also am spezifischsten durch diese letztere P-450 - Isoform erfolgt. Bezüglich der Progesteron-16α-Hydroxylierung ist eine solche Aussage anhand der Einpunktmessungen von Tabelle 5 nicht möglich.

P-450 - Isoform Nr.	Substrat [µM]	Hydroxylierung von Progesteron [mU/nMol P-450] in Position: 16α	6β	21	2-Hydroxylierung von Östradiol [mU/nMol P-450]
1	45	0.50	0.70	7.60	n.d.
2		0.20	0.20	< 0.01	n.d.
3b NZW		4.70	2.50	< 0.01	n.d.
3b IIIVO/J		4.80	0.20	< 0.01	n.d.
3c		n.d.	n.d.	< 0.01	n.d.
4		0.20	0.60	< 0.01	n.d.
6	↓	0.30	1.20	0.30	n.d.
1	10	0.20	0.35	5.80	3.80
2		0.07	0.07	< 0.01	< 0.10
3b NZW		2.50	1.0-2.8	< 0.01	< 0.10
3b IIIVO/J		2.50	0.04	< 0.01	< 0.10
3c		0.02	0.04	< 0.01	< 0.10
4		0.06	0.10	< 0.01	0.50
6	↓	0.20	0.60	0.20	0.60

TABELLE 5: Regionspezifische Katalyse der Hydroxylierung von Progesteron und Östradiol durch P-450- Isoformen aus Lebern einzelner Kaninchen (NZW oder IIIVO/J). Die angegebenen Aktivitäten sind mittlere Bildungsraten des betreffenden Produktes bei den jeweiligen Anfangskonzentrationen von Substrat für mindestens zwei verschiedene Präparationen jeder P-450 - Isoform. Experimentelle Einzelheiten s. "Methoden".

Enzymkinetik und Vorkommen von Form 1 und Progesteron-21-Hydroxylierung in NZW-Kaninchen sind Gegenstand der Abschnitte III C.2. und IV.A.. Die vergleichende Charakterisierung der $6\beta^+$- und $6\beta^-$-Varianten von Form 3b ist wegen der weitreichenden Rückschlüsse auf die strukturelle Multiplizität des "Cytochrom P-450" dagegen ausführlich in den Abschnitten D.1.ff. dargestellt.

C.2. Charakterisierung von P-450 - Isoform 1.

Die Spezifität, mit der Form 1 sowohl die 21-Hydroxylierung von Progesteron als auch die 2-Hydroxylierung von Östradiol katalysiert, steht mit der guten Korrelation dieser beiden Aktivitäten in 21h-Mikrosomen (Abbildung 6b) in Übereinstimmung. Dennoch konnte Form 1 auch aus 21n-Mikrosomen isoliert werden. Im enzymkinetischen Vergleich unterscheiden sich 21n- und 21h-Form 1 sowohl durch ihren Vmax- wie ihren Km-Wert.

In der Auftragung nach Lineweaver-Burk (Abbildung 14) besteht zwischen der Anfangsgeschwindigkeit der 21-Hydroxylierung von Progesteron und der Substrat-Konzentration, unabhängig von der für die Isolierung von Form 1 benutzten Quelle, ein linearer Zusammenhang. Die graphisch ("least square fit") ermittelten enzymkinetischen Parameter sind Km = 1.8 μM und Vmax = 7.3 mU/nMol P-450 (21h). bzw. Km = 3.22 μM und Vmax = 3.17 mU/nMol P-450 (21n).

Diese Werte sind denjenigen sehr ähnlich, die an Präparationen einer P-450 - Isoform aus der Nebenniere des Rindes gemessen wurden, und die die 21-Hydroxylierung sowohl von Progesteron als auch von 17α-Hydroxyprogesteron katalysiert (116,117).

Interessant ist, daß diese letztere Verbindung kein Substrat für Form 1 war (ohne Darst.). Mit der bekannten Tatsache, daß - im Gegensatz zu den Verhältnissen im Rind - die 21-Hydroxylierung 17α-hydroxylierter Steroid-Vorläufer im Kaninchen nur ein unbedeutender Stoffwechselweg ist (118), besteht also bezüglich der besonderen Eigenschaften dieses Leberenzyms kein Widerspruch.

Form 1 war ursprünglich als Nebenprodukt der Isolierung von Form 6 aus TCDD-behandelten NZW-Kaninchen entdeckt und 1977 noch als Form a bezeichnet worden (73). Es gelang während dieser Arbeit, Form 1 durch eine modifizierte Reinigungsmethode auch aus Mikrosomen unbehandelter Tiere zu erhalten. Neben der spezifischen Aktivität war auch die Ausbeute besonders hoch, wenn 21h-Mikrosomen als Quelle benutzt worden waren. Die Identifizierung Form 1-haltiger Fraktionen

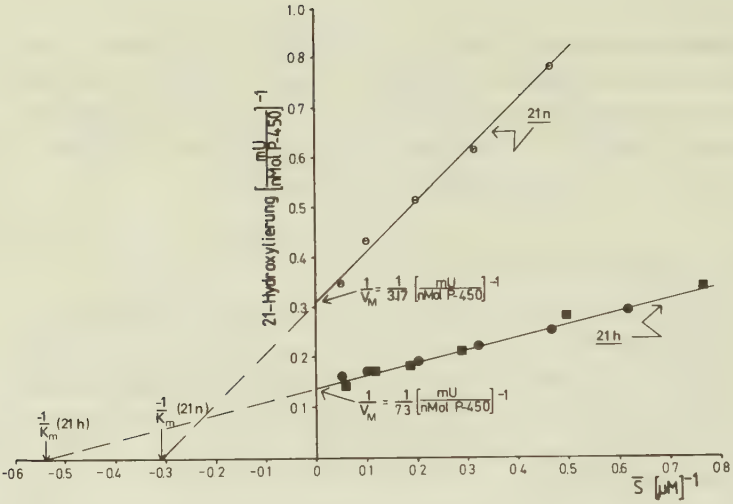


ABBILDUNG 14: 21-Hydroxylierung von Progesteron in Gegenwart verschiedener Form 1 - Präparationen aus einzelnen NZW-Kaninchen und NADPH im Rekonstituierten System. Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Substrat-Konzentration (Auftragung n. Lineweaver-Burk).

21n: Beispielhafte Präparation für alle Präparationen aus 21n-Mikrosomen (offene Symbole).

21h: 2 beispielhafte Präparationen für alle Präparationen aus 21h-Mikrosomen (geschlossene Symbole).

(Weitere Erläuterungen: vgl. Text S. 45 und 59.)

während der einzelnen Reinigungsschritte war dann wesentlich erleichtert wegen der hohen Spezifität der Umsetzung von Progesteron zu DOC durch diese Isoform.

In der SDS-PAGE wandert Form 1 nur geringfügig schneller als Form 2 (Abbildung 15), und besteht wie diese aus einer einzigen Bande. Proteinchemisch lassen sich beide Isoformen anhand ihrer Reaktion gegenüber einem gegen Isoform 2 entwickelten Antikörper, sowie durch eindimensionale Peptidkartierung leicht voneinander unterscheiden (71).

D. Vergleich von "6ß$^+$-Form 3b" mit der elektrophoretisch identischen "6ß$^-$-Form 3b".

In Abschnitt C.1. war es gelungen, zwei nach bisheriger Kenntnis identische Präparationen von Form 3b (vgl. Abbildung 3) erstmals durch ein funktionelles Kriterium voneinander zu unterscheiden: Form 3b aus 6ß$^-$-Mikrosomen katalysierte bei Sättigung mit Substrat die 6ß-Hydroxylierung von Progesteron bis zu 70-mal langsamer als Form 3b aus 6ß$^+$-Mikrosomen.

Die nun folgenden experimentellen Schritte haben das Ziel, diesen funktionellen Unterschied bezüglich möglicher Substrate einzugrenzen (D.2.1.) und ihn für das Modellsubstrat Progesteron zu quantifizieren (D.2.3.ff.). Vorausgeschickt wird der definitive Nachweis ihrer chromatographischen und elektrophoretischen Identität (D.1.), sowie der Abwesenheit enzymkinetischer Störfaktoren (D.2.2.). In D.3. schließlich kommen chemische Unterscheidungskriterien zur Anwendung.

D.1 Reinigung und Elektrophorese

Präparationen von Isoform 3b aus IIIVO/J-Mikrosomen waren bezüglich Ausbeute und Hämgehalt identisch mit Präparationen aus NZW-Mikrosomen (vgl. Text S. 32 und ref. 81). Der spezifische Hämgehalt allerentsprechend einer gegenüber den Angaben in (81) leicht modifizierten Reinigungsmethode erhaltenen Präparationen betrug im Mittel 17.8 nMol P-450/mg, bei einer Gesamtausbeute von 4% (Mikrosomen: 100% P-450).

Wie Abbildung 16 zeigt, sind beide Form 3b-Varianten bezüglich ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit und Reinheit nicht voneinander zu unterscheiden. Beide liefern eine einzige Hauptbande, daneben eine schwache Bande mit wesentlich höherem Molekulargewicht. Diese letztere ist gewohnter Bestandteil von Isoform 3b in der SDS-PAGE und wurde von Koop und Coon auf die Bildung von Dimeren zurückgeführt (119).

Zusammen mit dem identischen Hämgehalt aller Präparationen ergibt sich als Schluß-

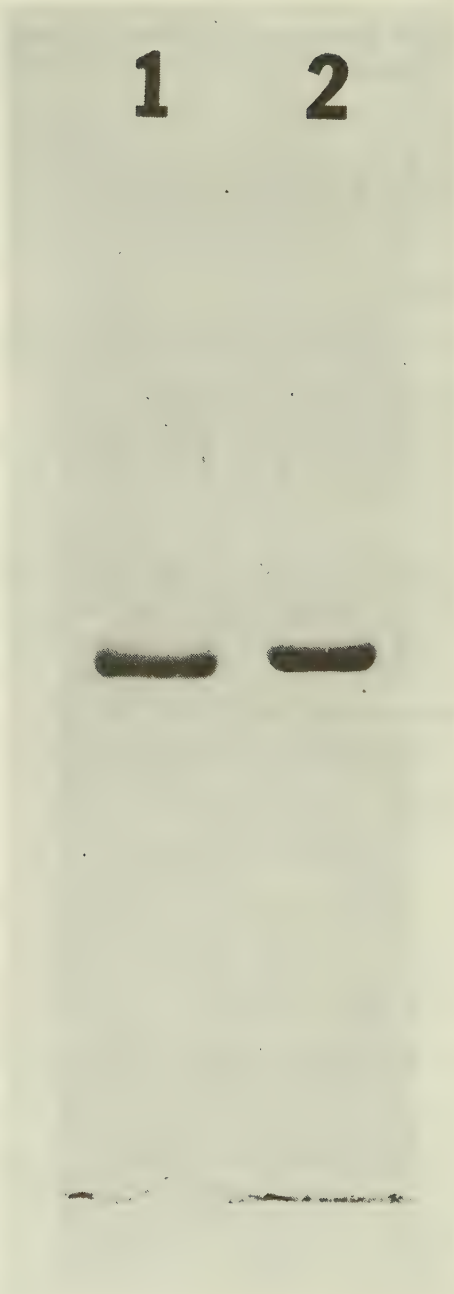


ABBILDUNG 15:

Polyacrylamid (7.5%)/Schichtgel - Elektrophorese der P-450 - Isoformen 1 und 2 aus Kaninchenleber. Durchführung der Elektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat und Puffersystem sind bei Laemmli (105) beschrieben. Wanderungsrichtung von oben nach unten. Jede Bahn (nominelle Ausmaße: 1.5 x 10 x 100 mm) enthält ca. 3 µg Protein.

ABBILDUNG 16: Polyacrylamid (7.5%)/Schichtgel - Elektrophorese von P-450 - Isoform 3b aus NZW- und IIIVO/J-Kaninchenleber. Erläuterungen s. Abb. 15. Bei den beiden schwachen Banden handelt es sich vermutlich um Dimere der elektrophoretischen Form 3b (119).

Links: Form 3b aus NZW-Kaninchen;
Rechts: Form 3b aus IIIVO/J-Kaninchen.

folgerung aus der SDS-PAGE, daß die angewandte Reinigungsmethode, ungeachtet der Verwendung von 6ß$^+$- oder 6ß$^-$-Mikrosomen als Ausgangsmaterial, eine P-450 - Isoform von gleicher Größe (Molekulargewicht) und Reinheit liefert.

D. 2 Funktioneller Vergleich

D.2.1 Metabolismus von Fremdstoffen im Rekonstituierten System (Einpunkt-Messungen).

Trotz ihres deutlich unterscheidbaren Verhaltens gegenüber dem Substrat Progesteron gelang es überraschenderweise nicht, die beiden Form 3b - Varianten auch hinsichtlich der Umsetzung exogener Substrate unterschiedlich zu charakterisieren.

Im rekonstituierten System mit NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase und Dilauroyl-L-a-Lecithin besitzen 6ß$^+$-Form 3b und 6ß$^-$-Form 3b dieselben Aktivitäten bei der Katalyse von 2-Acetylaminofluoren (30),Biphenyl,Aminopyrin oder Benzphetamin (81).

Tabelle 6 enthält die entsprechenden Zahlenwerte,sowie zur besseren Gegenüberstellung nochmals die Progesteron betreffenden Daten aus Tabelle 5. Es fällt auf, daß 6ß$^-$-Form 3b lediglich 1-2% der 6ß-hydroxylierenden Aktivität von 6ß$^+$-Form 3b besitzt, obwohl sich beide Formen gegenüber den 4 exogenen Substraten identisch verhalten. Auch gegenüber den "schlechten" Form 3b - Substraten Benzo(a)pyren und 7-Äthoxyresorufin (81) bestanden zwischen 6ß$^+$-Form 3b und 6ß$^-$-Form 3b keine Unterschiede (o. Darst.).

Die bis zu 70-mal höhere 6ß-hydroxylierende Aktivität der 6ß$^+$-Form geht weit über das hinaus, was bezüglich des Positions- und Substrat-spezifischen Metabolismus zahlreicher Substrate in Gegenwart elektrophoretisch unterscheidbarer P-450 - Isoformen bisher an Unterschieden beobachtet wurde (20,21,29,76,79-81,120). Die große Streubreite dieser Aktivität (1.0 - 2.8 mU/nMol P-450) beruht auf reproduzierten Schwankungen zwischen verschiedenen 6ß$^+$-Formen und wird zusammen mit ebensolchen Schwankungen der Vmax-Werte in Abschnitt D.2.5. behandelt.

D.2.2. Ausschluß enzymkinetischer Störfaktoren

Um unterschiedliche Sekundärmetabolismusraten oder die Anwesenheit eines niedermolekularen endogenen Inhibitors (Aktivators) der 6ß-Hydroxylierung von Progesteron in 6ß$^-$-Form 3b (6ß$^+$-Form 3b) auszuschließen, wurden beide Varianten in bekannten

Substrat	6β⁺-Form 3b	6β⁻-Form 3b
2-AAF[1)]	1.0	1.0
Biphenyl (4-Hydroxylierung)	2.90	2.70
Aminopyrin	28.4	27.6
Benzphetamin	11.5	12.2
Progesteron (Tab.5)		
16α-Hydroxylierung	2.5	2.5
6β-Hydroxylierung	1.0-2.8	0.04

1) Bestimmung durch S.Thorgeirsson,Nat.Cancer Inst.,USA.

TABELLE 6: Vergleich der Umsetzung verschiedener Fremdstoffe und von Progesteron durch 6β⁺- und 6β⁻-Form 3b. Angaben in [mU/nMol P-450]. Experimentelle Einzelheiten s. "Methoden".

Molarer Anteil an 6β⁺-Form 3b	Molarer Anteil an 6β⁻-Form 3b	Progesteron-6β-Hydroxylierung Beobachtet [mU/nMol P-450]	Progesteron-6β-Hydroxylierung Erwartet [mU/nMol P-450]
1.00	0.00	1.07	--
0.75	0.25	0.84	0.81
0.50	0.50	0.58	0.54
0.25	0.75	0.27	0.29
0.00	1.00	0.03	--

TABELLE 7: Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Progesteron-6β-Hydroxylierung vom Mischungsverhältnis der beiden Form 3b-Varianten im Rekonstituierten System. Beide Varianten wurden in den angegebenen Verhältnissen gemeinsam mit Lipid und P-450 - Reduktase rekonstituiert und die Progesteron-6β-Hydroxylierung wie in "Methoden" angegeben durchgeführt. Progesteron-Anfangskonzentration: 10 μM.

vgl. Text S. 64 und 66.

Anteilen gemischt und die resultierenden Aktivitäten im rekonstutierten System gemessen. Ihre strenge Additivität (Tabelle 7) schließt,ähnlich wie schon im Fall der Charakterisierung von 21h- und 21n- oder von 6ß$^+$- und 6ß$^-$-Mikrosomen (Tabellen 2 und 3),diese 2 Möglichkeiten als Erklärung für den gefundenen funktionellen Unterschied zwischen den beiden Form 3b - Varianten aus. Falls überhaupt, so würde es sich also um einen extrem fest gebundenen Inhibitor (Aktivator) handeln, der alle zur Darstellung von Form 3b nötigen Reinigungsschritte unbeschadet durchlaufen haben müßte.

Die Anwesenheit eines solchen niedermolekularen Liganden erscheint aber auch deshalb unwahrscheinlich, weil alle anderen Reaktionen von beiden Form 3b - Varianten im gleichen Ausmaß katalysiert werden, und deshalb die Anforderungen an die Spezifität einer solchen niedermolekularen Struktur extrem hoch wären.

D.2.3. Enzymkinetischer Vergleich der Progesteron-Hydroxylierung durch 6ß$^+$- und 6ß$^-$-Form 3b.

D.2.3.1.6ß-Hydroxylierung

Die Substrat-Abhängigkeit der Progesteron-6ß-Hydroxylierung in Gegenwart je einer der beiden Form 3b - Varianten zeigt Abbildung 17. Alle Präparationen aus dem Inzuchtstamm IIIVO/J (6ß$^-$) weisen eine wesentlich höhere Km auf als die meisten (23/24) der Präparationen aus NZW-Tieren (6ß$^+$). Diese Situation spiegelt genau den Unterschied zwischen den jeweils als Präparationsquelle benutzten Mikrosomen-Typen IIIVO/J (6ß$^-$) bzw. 23/24 NZW (6ß$^+$) wider (s. Abbildung 9).

Der Km-Wert der 6ß$^-$-Form 3b liegt so hoch, daß er, wie schon im Fall der IIIVO/J- und 1/24 NZW-Mikrosomen, nur mit "größer als 60 µM" angegeben werden kann. Die 6ß$^+$-Form dagegen besitzt für die 6ß-Hydroxylierung von Progesteron einen Km-Wert von knapp 1 µM. Diese weitere Verringerung gegenüber 6ß$^+$-Mikrosomen um den Faktor 4 ist nicht erstaunlich, wenn man bedenkt, daß es sich im Fall der Mikrosomen um eine apparente Km gehandelt haben muß. Zu ihrer Meßbarkeit als "Misch"-Km haben mit Sicherheit nicht nur 6ß$^+$-Form 3b, sondern auch andere, bezüglich Progesteron weniger affine P-450 - Isoformen (s. Tabelle 5) einen hier nicht näher quantifizierbaren Beitrag geleistet. Die Nicht-Auffindbarkeit einer hochaffinen Km für die 6ß-Hydroxylierung in denselben Mikrosomen-Präparationen, aus denen regelmäßig 6ß$^-$-Form 3b isoliert wurde, signalisiert allerdings, daß die hochaffine Km von 6ß$^+$-Mikrosomen immerhin überwiegend auf die dort anwesende 6ß$^+$-Form 3b zurückgeht.

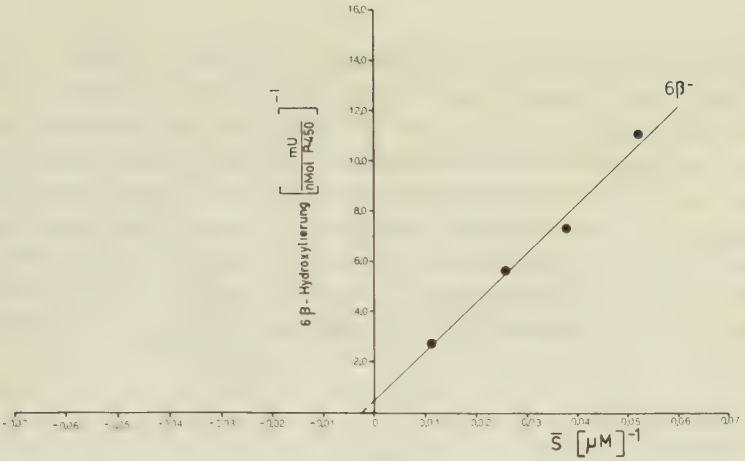


ABBILDUNG 17a: 6β-Hydroxylierung von Progesteron in Gegenwart einer beispielhaften 6β⁻-Form 3b und NADPH im Rekonstituierten System. Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Substrat-Konzentration (Auftragung nach Lineweaver-Burk). Als Quelle für diese Präparation diente die Leber eines männl. IIIVO/J-Kaninchens.

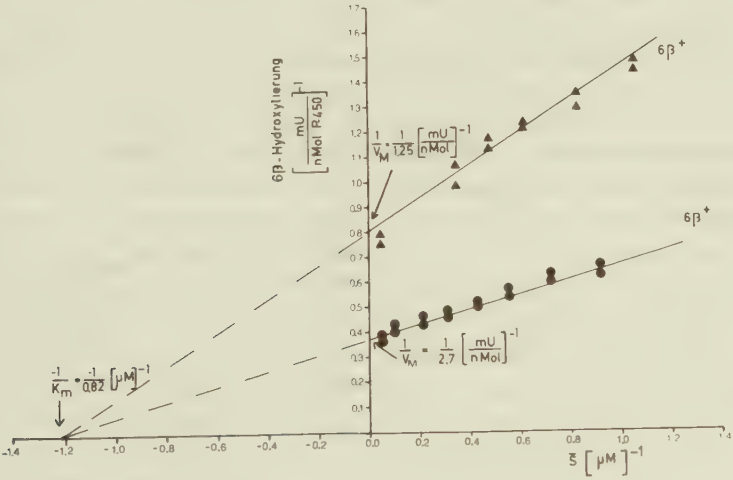


ABBILDUNG 17b: 6β-Hydroxylierung von Progesteron in Gegenwart zweier beispielhafter 6β⁺-Formen 3b und NADPH im Rekonstituierten System. Aufgetragene Parameter und Auftragungsmodus s. Abb.17a; beachte jedoch die stark veränderten Skalenspreizungen. Präparationsquelle: 6β⁺-Mikrosomen je einer einzelnen Leber zwei verschiedener NZW-Tiere.

Die unterschiedliche Steigung der beiden Geraden in Abbildung 17b ($6\beta^+$-Formen) ist nicht etwa das Ergebnis experimentell bedingter Meßschwankungen mit jeweils derselben Form 3b - Variante. Dies wird schon durch die vollkommen getrennte Lage der beiden Meßpunktreihen angedeutet. Es handelt sich vielmehr um das reproduziert unterschiedliche Verhalten zweier verschiedener $6\beta^+$-Präparationen. Es war auch in Tabelle 5 (Einpunkt-Messungen) zum Ausdruck gekommen. Der höchste gemessene Vmax-Wert für die 6β-Hydroxylierung in Gegenwart einer $6\beta^+$-Form 3b betrug 2.9 mU/nMol P-450, der niedrigste lag bei 1.2 mU/nMol P-450. Die Unterschiedlichkeit dieser Werte wird im Zusammenhang mit der Beschreibung von Tabelle 8 eingehender erörtert (Text S. 77 ff.).

D.2.3.2. 16α-Hydroxylierung

Beide Form 3b - Varianten unterschieden sich auch hinsichtlich der simultan zur 6β-Hydroxylierung katalysierten 16α-Hydroxylierung. Dies zeigt beispielhaft Abbildung 18. Nur für $6\beta^+$-Präparationen lieferte die Lineweaver-Burk - Auftragung neben einer niederaffinen auch eine hochaffine Phase. Sie ist durch apparente Km- bzw. Vmax-Werte von ca. 4 µM bzw. bis zu 2.7 mU/nMol P-450 gekennzeichnet.

An der $6\beta^-$-Form 3b war dagegen nur eine niederaffine Phase zu beobachten. Sie geht, wie aus Abbildung 18 ersichtlich, ab einer Substrat-Konzentration von ca. 10µM in die niederaffine Phase von $6\beta^+$-Präparationen über.

Bei kleineren Substrat-Konzentrationen ist diese Phase nicht linear im Sinne einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik; vielmehr deutet sie durch ihre leicht konkave Krümmung auf positive Kooperativität, d.h. schneller als linear ansteigende Umsatzgeschwindigkeit mit steigender Substrat-Konzentration. In den $6\beta^+$-Präparationen ist die niederaffine 16α-hydroxylierende Phase erst ab Substrat-Konzentrationen unter 10µM durch die dann effektivere hochaffine Phase maskiert. Über dieser Konzentration leistet, wie sich auch leicht aus den apparenten Vmax/Km-Verhältnissen ableiten läßt, in Gegenwart von $6\beta^+$-Form 3b die niederaffine Phase den größeren Beitrag zur Entstehung von 16α-Hydroxyprogesteron. Der hohe Vmax-Wert dieser Phase ist dafür verantwortlich, daß trotz der Abwesenheit der hochaffinen Phase in $6\beta^-$-Form 3b beide Form 3b - Varianten bei hohen Substrat-Konzentrationen Progesteron zwar gleichschnell in 16α-, nicht aber in 6β-Position hydroxylieren (vgl. auch Tabelle 5).

Die Zweiphasigkeit der 16α-Hydroxylierung in Gegenwart von $6\beta^+$-Form 3b erlaubt nicht die Ableitung eindeutiger enzymkinetischer Parameter für diese Reaktion.

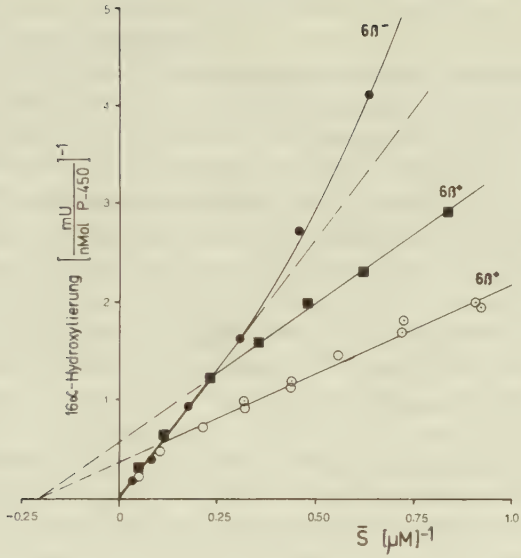


ABBILDUNG 18: 16α-Hydroxylierung von Progesteron in Gegenwart einer $6\beta^-$- und zwei verschiedener $6\beta^+$-Präparationen von Form 3b und NADPH im Rekonstituierten System. Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Substrat-Konzentration (Auftragung n. Lineweaver-Burk). Die Kinetik der $6\beta^+$-Formen ist zweiphasig, diejenige der $6\beta^-$-Form positiv kooperativ (Substrat-Aktivierung).

Dies wurde bereits durch ihre Einführung (S.68) als apparente Parameter angedeutet. Zwischen verschiedenen 6ß$^+$-Präparationen wurden zwar ähnliche Vmax-Schwankungen der hochaffinen Phase wie im Fall der hochaffinen 6ß-Hydroxylierung beobachtet, doch würden diese Schwankungen für sich gesehen keine große Aussagekraft besitzen. Sie werden deshalb zusammen mit den Vmax-Schwankungen der hochaffinen 6ß-Hydroxylierung durch 6ß$^+$-Form 3b bei Tabelle 8 behandelt (D.2.5.).

Andererseits lassen sich wegen der positiven Kooperativität der niederaffinen 16α-Hydroxylierung auch für 6ß$^-$-Form 3b keine eindeutigen enzymkinetischen Parameter angeben. Die Extrapolation der Lineweaver-Burk-Auftragung für sehr hohe Progesteron-Konzentrationen führt in den Null/Null-Punkt des Koordinatensystems, also zu hypothetisch unendlich großen Zahlenwerten für Vmax und Km. Bezüglich der niederaffinen Phase ist also keine der beiden Form 3b - Varianten mit Substrat zu sättigen. Aus dem schon angeführten Grund (S.49) erscheint es nicht sinnvoll, hierfür einen höheren Km-Wert als 60 µM anzugeben.

Die Vmax dieser Phase liegt mit Sicherheit höher als der höchste gemessene Wert, ist also größer als 5 mU/nMol P-450. Bereits dieser Wert ist 2- bis 5-mal höher als der für die hochaffine 6ß-Hydroxylierung an der 6ß$^+$- Variante von Form 3b, oder als apparente Vmax für deren hochaffine 16α-hydroxylierende Phase gemessene Wert.

Positiv kooperative Beziehungen zwischen Enzym und Substrat sind bisher zwar schon häufig für Mikrosomen, aber erst selten für isolierte und elektrophoretisch einheitliche P-450 - Isoformen beschrieben worden, z.B. für Isoform 3c aus Kaninchenleber nach Rekonstitution in Phospholipid-Vesikeln (121).

Abschließend zu diesem Teilabschnitt sei erwähnt, daß selbstverständlich versucht wurde, die Komplexität der Kinetik der 16α-Hydroxylierung durch 6ß$^+$-Form 3b auch auf andere Weise, etwa durch ein experimentelles Artefakt, zu erklären. Es hätte zum Beispiel sein können, daß der als 16α-Hydroxyprogesteron identifizierte Fleck (vgl. Abbildung 5) eine Komponente enthielt, deren Bildung aus Progesteron anderen enzymkinetischen Parametern gehorchte als diejenige von 16α-Hydroxyprogesteron selbst. Dadurch wäre die Zweiphasigkeit der Bildung dieses Fleckes erklärbar geworden ohne die Zusatzannahme, das Enzym besitze 2 verschiedene Phasen bezüglich der Bildung von 16α-Hydroxyprogesteron.

Durch TLC in 10 verschiedenen Laufmittelsystemen (ohne Darst.) gelang es jedoch nicht, eine zweite Komponente in dem 16α-Hydroxyprogesteron-Fleck festzustellen. Zusätzlich überprüfte ich seine Homogenität massenspektrometrisch. Molekül-

bruchstücke über diejenigen hinaus, die von 16α-Hydroxyprogesteron zu erwarten waren, waren nicht aufzufinden, so daß eine Heterogenität dieses Flecks als Erklärung für die Nichtlinearität der Kinetik der 16α-Hydroxylierung mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit auszuschließen ist.

Andere Möglichkeiten, die erwogen werden mußten, waren die Betrachtung des Substrates als sein eigener negativer Effektor, die Anwesenheit eines endogenen mitgereinigten Inhibitors (Aktivators) oder Artefakte des Rekonstitutionsprozesses. Die Anwesenheit eines Inhibitors (Aktivators) war schon durch die in Zusammenhang mit Tabelle 7 durchgeführten Experimente ausgeschlossen worden; angesichts der Linearität der simultan dasselbe Substrat benutzenden 6β-Hydroxylierung erscheinen auch die beiden anderen "Stör"möglichkeiten äußerst unwahrscheinlich.

Die alternative (und biochemisch interessantere) Erklärungsmöglichkeit für die Zweiphasigkeit der 16α-Hydroxylierung (und der Abwesenheit der hochaffinen 6β-hydroxylierenden Aktivität in der $6\beta^-$-Form 3b) war die Annahme, $6\beta^+$-Form 3b enthalte mehrere (mindestens zwei) enzymkinetisch aktive Subformen oder katalytisch aktive Zentren. Weitere Nachweise hierfür werden in den folgenden Teilabschnitten erbracht.

D.2.4. Differentielle Hemmung der 6ß- und der 16α-Hydroxylierung von Progesteron durch 16α-Methylprogesteron.

Ein schlüssiger experimenteller Beweis für die Anwesenheit zweier katalytischer Zentren in $6\beta^+$-Form 3b wurde durch die Untersuchung der enzymkinetischen Wechselwirkungen dieses Enzym mit dem Substrat-Analogen 16α-Methylprogesteron erhalten. Diese Substanz erwies sich bezüglich der hochaffinen 6ß-Hydroxylierung von Progesteron als sehr effektiver kompetitiver Inhibitor.

Aus der Auftragung nach Dixon (Abbildung 19) läßt sich für diese Reaktion eine Hemmkonstante von Ki = 1 µM ablesen, Dies ist praktisch derselbe Wert, wie er für die hochaffine 6ß-Hydroxylierung auch als Km erhalten wurde (Abbildung 17b). Dies bedeutet, daß 16α-Methylprogesteron spezifisch die Bildung desjenigen Enzym-Substrat-Komplexes verhindert, als dessen Produkt 6ß-Hydroxyprogesteron erhalten wird (97).

Falls alle Hydroxylierungen in einem einzigen katalytischen Zentrum in $6\beta^+$-Form 3b ablaufen, wäre allerdings zu erwarten gewesen, daß auch die 16α-Hydroxylierung von Progesteron in kompetitiver Weise von dieser Substanz gehemmt würde. Wie die rechte Hälfte von Abbildung 19 zeigt, ist dies nicht der Fall. Die 16α-Hydroxylierung wird bis herab zu einer Substrat-Konzentration von 2.8 µM durch 16α- Methylprogesteron überhaupt nicht gehemmt. Darunter ist je nach Effektor-Konzentration entweder eine leichte Inhibierung ([16α-Methylprogesteron] < 5 µM) oder - völlig unerwartet - sogar eine leichte Aktivierung ([16α-Methylprogesteron] > 10 µM) zu beobachten.

Die Lineweaver-Burk - Auftragung der 16α-Hydroxylierung durch $6\beta^+$-Form 3b in Gegenwart von 10 µM 16α-Methylprogesteron dagegen ist linear (Abbildung 20). Sie extrapoliert ebenso wie die niederaffine 16α-hydroxylierende Phase aus Abbildung 18 auf den Null/Null-Punkt des Koordinatensystems. Daraus, und aus dem Verlust der Zweiphasigkeit der Katalyse dieser Reaktion in Abbildung 20 ist zu schließen, daß 16α-Methylprogesteron nicht nur die hochaffine 6ß-hydroxylierende Phase (Abbildung 19), sondern auch die hochaffine 16α-hydroxylierende Phase von $6\beta^+$-Form 3b hemmt. Wegen der Überlappung von hoch- und niederaffiner Phase kann aber nicht entschieden werden, ob es sich auch im zweiten Fall um ein kompetitives Hemmschema handelt.

Wichtig in diesem Zusammenhang ist noch die Beobachtung, daß die Hemmung nur innerhalb desjenigen Substrat-Konzentrationsbereichs nachweisbar ist, wo die hochaffine 16α-Hydroxylierung überwiegt, also unter 10 µM Progesteron (vgl. Abb. 18). Besonders deutlich wird dies aus Abbildung 21: Zwei bezüglich ihrer apparenten Vmax-Werte

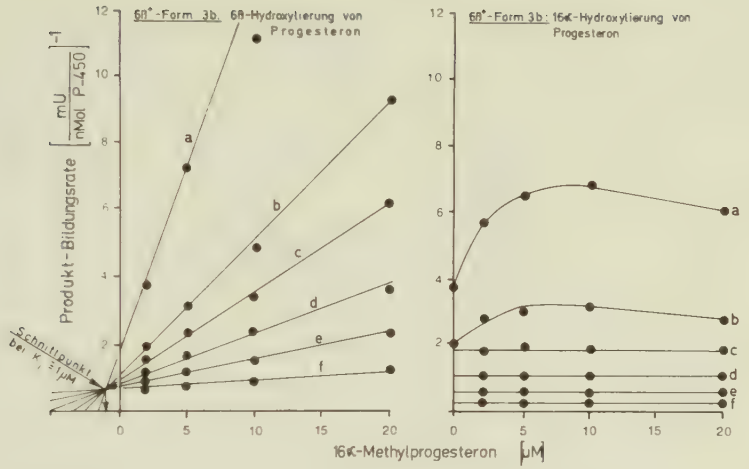


ABBILDUNG 19: Hemmung der 6β-Hydroxylierung (links) und Hemmung/Aktivierung der 16α-Hydroxylierung (rechts) von Progesteron in Gegenwart einer beispielhaften $6\beta^+$-Form 3b und NADPH durch 16α-Methylprogesteron im Rekonstituierten System. Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von Substrat- und Effektor-Konzentration (Auftragung n. Dixon). Die 6β-Hydroxylierung ist bei allen Effektor-Konzentrationen gehemmt, wogegen sich die 16α-Hydroxylierung bei niedrigen Substrat-Konzentrationen aus einem aktivierten ([16α-Methylprogesteron] $\geq$ 8 µM) und einem gehemmten ([16α-Methylprogesteron] $\leq$ 8 µM) Anteil zusammensetzt und bei hohen Substrat-Konzentrationen unbeeinflußt scheint.

Die einzelnen Substrat-Konzentrationen sind
a: 0.8 µM; b: 1.8 µM; c: 2.8 µM; d: 4.8 µM; e: 8.2 µM; f: 18.0 µM.

Als Präparationsquelle für die getestete $6\beta^+$-Präparation dienten $6\beta^+$-Mikrosomen aus der Leber eines einzelnen NZW-Tieres.

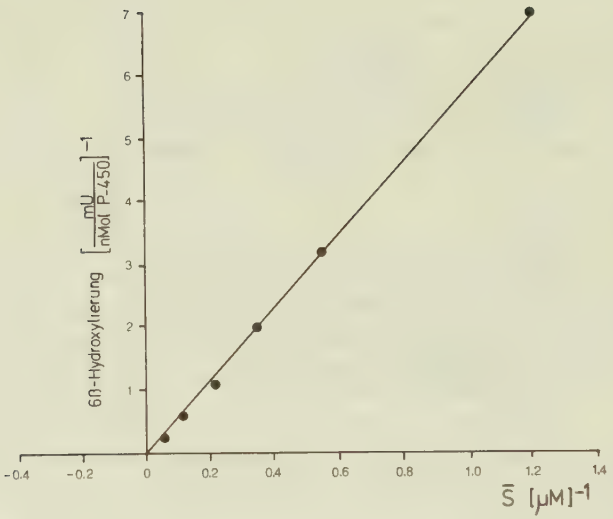


ABBILDUNG 20: 16α-Hydroxylierung von Progesteron in Gegenwart einer beispielhaften 6β^{+}-Form 3b,NADPH und 10 µM 16α-Methylprogesteron im Rekonstituierten System. Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Substrat-Konzentration (Auftragung n. Lineweaver-Burk). Im Gegensatz zu Abb.18 (S.69) wurde für alle 6β^{+}-Formen 3b jetzt nur eine kinetische Phase erhalten,die sich allerdings aus einem aktivierten und einem gehemmten Anteil zusammensetzen muß (vgl. auch Erläuterung zu Abb.21 im Text,S.72 u. 76).

Herkunft dieser 6β^{+}-Form 3b: s. Abb.19.

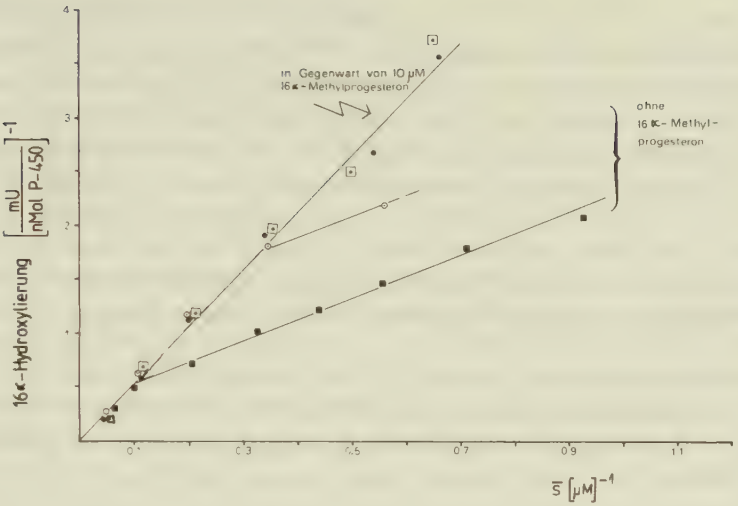


ABBILDUNG 21: 16α-Hydroxylierung von Progesteron in Gegenwart zweier beispielhafter 6ß$^{+}$-Präparationen von Form 3b und NADPH im Rekonstituierten System, sowie der An- oder Abwesenheit von 10 µM 16α-Methylprogesteron. Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Substrat-Konzentration (Auftragung nach Lineweaver-Burk).

Offene Symbole: Präparation 1 in An- oder Abwesenheit von 16α-Methylprogesteron ("niederaffine" Katalyse bei $[\bar{S}] \geq 3$ µM)

Geschlossene Symbole: Präparation 2 in An- oder Abwesenheit von 16α-Methylprogesteron ("niederaffine" Katalyse bei $[\bar{S}] \geq 10$ µM).

Beide Präparationen stammten aus der Leber von je einem NZW-Kaninchen.

verschiedene 6β$^+$-Formen 3b liefern in Gegenwart von 10 µM 16α-Methylprogesteron praktisch deckungsgleiche Lineweaver-Burk-Auftragungen für die 16α-Hydroxylierung von Progesteron; die hierfür erhaltene Gerade ist identisch mit derjenigen Geraden, durch die sich auch die niederaffine 16α-Hydroxylierung in Abwesenheit von 16α-Methylprogesteron darstellen läßt. Erstere muß sich allerdings - wie in III.D.2.3.2. bereits ausgeführt - je nach Substrat-Konzentration aus einem niederaffinen und einem hochaffinen Anteil zusammensetzen. Die Geradenform in Gegenwart des Effektors ist nur zu verstehen, wenn man annimmt, die kompetitive (oder anders zu charakterisierende) Hemmung der hochaffinen Phase werde durch eine entsprechende Aktivierung der niederaffinen Phase bei dieser Effektor-Konzentration gerade ausgeglichen.

Diese Interpretation steht in Übereinstimmung mit der Dixon-Auftragung der rechten Hälfte von Abbildung 19 (Kurven a und b), bei deren Beschreibung bereits auf die hemmenden und gleichzeitig aktivierenden Eigenschaften von 16α-Methylprogesteron hingewiesen wurde.

Zusammenfassend spricht die in den Abbildungen 19 - 21 enthaltene enzymkinetische Evidenz dafür, daß ein- und derselbe Effektor die beiden durch eine niedere Km charakterisierten Reaktionen simultan hemmt. Zusätzlich wird die spätestens ab Substrat-Konzentrationen von mehr als 10 µM überwiegend ablaufende 16α-Hydroxylierung durch denselben Effektor nicht nur nicht gehemmt, sondern sogar leicht aktiviert. Sowohl die differentielle Hemmung/Nichthemmung beider Reaktionen ("6β hochaffin"/"16α niederaffin") als auch die differentielle Hemmung/Aktivierung der einen dieser beiden Reaktionen ("16α hochaffin"/"16α niederaffin") durch ein- und dieselbe Verbindung, nämlich den Effektor 16α-Methylprogesteron, lassen sich nur durch die Zusatzannahme erklären, daß 6β$^+$-Form 3b zwei katalytisch aktive Zentren besitzt. Dies müssen sein:

1) ein hochaffines Zentrum 1 für die simultan ablaufende 6β- und 16α-Hydroxylierung, sowie
2) ein niederaffines Zentrum 2 nur für die 16α-Hydroxylierung von Progesteron.

Als weiterreichende Schlußfolgerung ergibt sich daraus für die Interpretation der Abbildungen 17 und 18, daß die aus IIIVO/J-Kaninchen isolierbare Form 3b-Variante (6β$^-$-Form 3b) nur das niederaffine Zentrum 2 besitzt. Beide Zentren kommen also biologisch zwar getrennt vor, lassen sich aber bisher weder physikochemisch (chromatographisch und elektrophoretisch) voneinander trennen, noch strukturell in definierter Weise voneinander abgrenzen.

D.2.5. Variation der Vmax-Werte zwischen verschiedenen 6ß$^+$-Formen 3b

Die Abschnitte D.2.3. und D.2.4. haben mit enzymkinetischen Methoden gezeigt, daß es strukturelle Elemente (katalytische Zentren) des mikrosomalen "Cytochrom P-450" gibt, die sich einer physikochemischen Trennung und strukturellen Identifizierung bisher erfolgreich widersetzt haben. Dennoch kommen sie auf der biologischen (in vivo-) Ebene getrennt vor und unterscheiden sich funktionell voneinander.

Aus ihrem getrennten Vorkommen in NZW- und IIIVO/J-Kaninchen darf aber nicht ohne weiteres der Schluß gezogen werden, beide Zentren seien innerhalb von 6ß$^+$-Form 3b auf zwei selbstständigen Strukturelementen (Polypeptidketten ?) lokalisiert, deren eines in IIIVO/J-Kaninchen eben nicht zum phänotypischen Ausdruck komme. Immerhin ließe sich für den Fall der Lokalisierung beider Zentren auf einer einzigen Polypeptidkette der Verlust von Zentrum 1 in den IIIVO/J-Kaninchen sogar sehr einfach durch Mutations-bedingten Austausch einer einzelnen Aminosäure in diesem Zentrum erklären. Falls diese Annahme zuträfe, müßten aber die von verschiedenen 6ß$^+$-Präparationen katalysierten hoch- und niederaffinen Aktivitäten immer im gleichen Zahlenverhältnis zueinander stehen, z.B. müßten dann alle 6ß$^+$-Formen 3b denselben Vmax-Wert für die (hochaffine) 6ß-Hydroxylierung von Progesteron aufweisen. Die Daten dieses Abschnittes werden zeigen, daß diese Bedingung nicht erfüllt ist.

Zwischen verschiedenen 6ß$^+$-Präparationen von Form 3b bestehen erhebliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Vmax-Werte für die hochaffine 6ß- und 16α-Hydroxylierung. Für beide Reaktionen variieren die gemessenen Werte innerhalb eines Faktors von 2 bis 3 (Abbildung 17 und 18, sowie Tabelle 8). Diese Variation ist wesentlich breiter als die von Versuch zu Versuch an derselben Präparation beobachteten Schwankungen (vgl. ebenfalls Tabelle 8). Sie ist auch breiter als entsprechende Beobachtungen bei der Charakterisierung anderer, elektrophoretisch unterscheidbarer P-450 - Isoformen, sofern hierfür exogene Substrate verwendet werden.

Eine gewisse Unsicherheit besteht allerdings hinsichtlich der Bewertung der Schwankungen der hochaffinen 16α-Hydroxylierung. Sie rührt daher, daß der relative Anteil der niederaffinen 16α-hydroxylierenden Phase nicht genau bekannt ist, so daß die graphisch ermittelten "hochaffinen" Vmax-Werte für diese Reaktion mit Sicherheit schon deshalb bestimmten Schwankungen unterworfen sind.

Dieser Punkt kann jedoch dahingestellt bleiben, da dieselben Schwankungen auch bei der hochaffinen 6ß-Hydroxylierung in Gegenwart verschiedener 6ß$^+$-Formen 3b auftreten, obwohl dort das Problem der Oberlagerung zweier verschieden affiner

Datum[1)]	Form 3b-Variante	Vmax-Werte [mU/nMol P-450] der 6ß-Hydroxylierung	16α-Hydroxylierung	Maximaler Hemmgrad[2)]
810211	$6ß^+$	2.7	3.4	54%
810211		2.6	3.0	52%
810211		2.6	3.3	58%
810305	$6ß^+$	1.25	1.60	28%
810415	$6ß^+$	1.0	1.70	34%
810428	$6ß^-$	0.04	> 10	0%
810503	$6ß^-$	0.04	>10	0%

[1)] Datum der ersten elektrophoretischen Charakterisierung der betreffenden Variante (Jahr,Monat,Tag).

[2)] vgl. Abb.22, Seite 80.

TABELLE 8: Vmax-Werte verschiedener Form 3b-Präparationen (beide Varianten) für die Hydroxylierung von Progesteron. Gegenüberstellung mit maximalen Hemmgraden der 4-Hydroxylierung von Biphenyl durch 16α-Methylprogesteron (vgl. Abb.22). Die verschiedenen Präparationen sind in der linken Spalte durch das Datum ihrer ersten elektrophoretischen Charakterisierung identifiziert. Die Parameter für Form 3b-810211 wurden in unabhängigen Versuchen dreimal gemessen. Die $6ß^-$-Formen 3b stammten aus der Leber von je einem IIIVO/J-Einzeltier, die $6ß^+$-Formen 3b aus der Leber von je einem NZW-Einzeltier.

Phasen nicht besteht. Als alternative Erklärung für diese Schwankungen liegt es also im Sinne der im ersten Absatz dieses Abschnitts geäußerten Vermutung tatsächlich nahe, von der Existenz zweier unabhängig voneinander variierender Strukturelemente in den 6ß$^+$-Formen 3b auszugehen.

Eine zusätzliche Stütze findet diese Hypothese durch die in Abbildung 22 dargestellten Hemmstudien der 4-Hydroxylierung von Biphenyl durch 16α-Methylprogesteron. Bereits früher wurde darauf hingewiesen, daß sowohl die 6ß$^+$- wie auch die 6ß$^-$-Form 3b Biphenyl bei Substratsättigung mit einer Rate von ca. 2.8 mU/nMol P-450 in Position 4 hydroxylieren (Tabelle 6). Abbildung 22 zeigt,daß sich diese Reaktion nur dann durch 16α-Methylprogesteron hemmen läßt,wenn 6ß$^+$-Form 3b der Katalysator ist. In Gegenwart von 6ß$^-$-Form 3b werden dagegen immer 100% Aktivität erhalten.

Bemerkenswert ist die Sättigung dieses Effektes lange bevor 100% Hemmung auch nur annähernd erreicht sind; spätestens ab 20 µM 16α-Methylprogesteron läßt sich keine zusätzliche Hemmung mehr erreichen, obwohl im einen Fall dann erst ca. 54%, im andern Fall sogar nur 30% Hemmung beobachtet werden. Das Ausmaß der durch 16α-Methylprogesteron erreichbaren Hemmung korreliert grob mit den jeweiligen Vmax-Werten der hochaffinen 6ß-Hydroxylierung verschiedener 6ß$^+$-Präparationen (Tab.8).

Die einzig mögliche Zusammenfassung und Interpretation der in Tabelle 8 und Abbildung 22 dargestellten Befunde besteht darin, daß sowohl die 16α-Hydroxylierung von Progesteron als auch die 4-Hydroxylierung von Biphenyl bei Substratsättigung simultan an den Zentren 1 und 2 von 6ß$^+$-Form 3b stattfindet. Die Umsetzung beider Substrate läßt sich zwar am hochaffinen, nicht aber am niederaffinen dieser beiden Zentren durch 16α-Methylprogesteron hemmen. Nichthemmbare und hemmbare Aktivität müssen sich auf zwei unabhängig voneinander variierenden Strukturanteilen von 6ß$^+$-Form 3b befinden.

6ß$^-$-Form 3b stellt demgegenüber einen Grenzfall dar, in der nur derjenige Strukturanteil von 6ß$^+$-Form 3b zur phänotypischen Ausprägung kommt, auf dem das niederaffine, Progesteron-16α-hydroxylierende und eines der Biphenyl-4-hydroxylierenden Zentren lokalisiert ist. In allen Form 3b-Varianten haben die entsprechenden Strukturanteile in einer Art zu variieren, die die Konstanz des Molekulargewichtes der elektrophoretischen Form 3b gewährleistet. Anders wäre deren Nicht-Unterscheidbarkeit durch SDS-PAGE nicht zu verstehen (s. Abbildung 16).

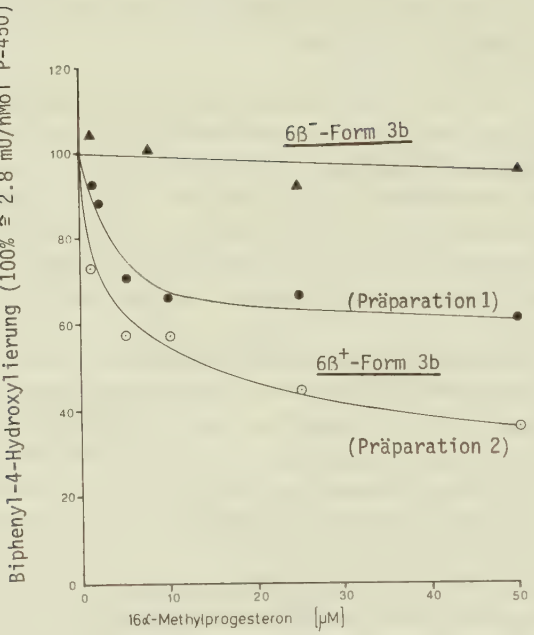


ABBILDUNG 22: Hemmung der 4-Hydroxylierung von Biphenyl in Gegenwart von 6β⁻- oder 6β⁺-Form 3b und NADPH im Rekonstituierten System durch 16α-Methylprogesteron. Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Effektor-Konzentration in % der ungehemmten Geschwindigkeit. In Gegenwart von 6β⁻-Form 3b tritt keine Hemmung auf.

Die beiden 6β⁺-Präparationen unterschieden sich bezüglich ihres Vmax-Wertes für die hochaffine 6β-Hydroxylierung von Progesteron um ca. den Faktor 2 (Präparationen 810305 und 810211 in Tab.8, Seite 78).

D.2.6. Differentielle Inhibierung und allosterische Aktivierung beider Form 3b--Varianten durch reduzierte Steroide.

In den Abschnitten D.2.3. bis D.2.5. war der Nachweis dafür erbracht worden, daß 6β$^+$-Form 3b mindestens zwei katalytisch aktive Zentren für die Hydroxylierung von Progesteron besitzen muß. Lediglich eines dieser Zentren läßt sich in 6β$^-$-Form 3b nachweisen.

In diesem und dem folgenden Abschnitt (D.3.1.) soll die Möglichkeit geprüft werden, ob beide Form 3b-Varianten eventuell noch ein allosterisches Zentrum 3 besitzen, durch dessen Vermittlung die niederaffine 16α-Hydroxylierung jeweils aktiviert wird. Wegen der einfacheren enzymkinetischen Verhältnisse soll zunächst 6β$^-$-Form 3b, dann erst die 6β$^+$-Variante untersucht werden.

In der Absicht,Steroide oder von Steroiden abgeleitende Verbindungen zu finden, die besser als 16α-Methylprogesteron die niederaffine 16α-Hydroxylierung aktivieren, wurden eine Reihe von Ring A-reduzierten Progesteron-Metaboliten sowie einige Androgene und natürliche und synthetische Glucocorticoide getestet. Ergebnisse aus Einpunktmessungen mit insgesamt 18 verschiedenen Substanzen in Gegenwart von 6β$^-$-Form 3b finden sich in Tabelle 9. Nur Ring A-reduzierte Verbindungen wirken aktivierend, wenn auch sehr unterschiedlich. Hemmungen waren nicht zu beobachten, wohl aber Aktivitätszunahmen um fast das Dreifache der Kontrollaktivität in Gegenwart von 10 μM Effektor.

Für eine nennenswerte Aktivierung haben die Verbindungen aus Tabelle 9 mindestens einem der folgenden strukturellen Erfordernisse zu genügen:

1) Die Reduktion der 20-Keto-Gruppe zur 20α-Hydroxygruppe erhöht im allgemeinen den Grad der Stimulation, wie der Vergleich der Wirkungen der Verbindungen 2 mit 8;3 mit 9 oder 4 mit 10 illustriert.

2) Ring A-reduzierte Verbindungen wirken praktisch nur dann aktivierend, wenn sie in 5β-Position reduziert sind; 5α-reduzierte Steroide sind unwirksam. Das Beispiel 5β-Dihydrotestosteron zeigt, daß dieses Strukturerfordernis von größerem Einfluß ist als die Anwesenheit einer Hydroxylgruppe in Position 20.

3) Die Reduktion der Ketogruppe in 3-Stellung führt nur dann zu einer aktivierenden Wirkung der betreffenden Verbindung, wenn die resultierende Hydroxylgruppe β-positioniert ist.

Effektoren	Aktivierungsgrade in % der Kontrollaktivität[1)2)]
20α-Hydroxyverbindungen:	
20α-Hydroxypregn-4-en-3-on	128 ± 16
20α-Hydroxy-5β-Pregnan-3-on	106 ± 27
20α-Hydroxy-5α-Pregnan-3-on	37 ± 5
3-Hydroxyverbindungen:	
3β-Hydroxy-5β-Pregnan-20-on	227 ± 1
3β-Hydroxy-5α-Pregnan-20-on	36 ± 20
3α-Hydroxy-5β-Pregnan-20-on	37 ± 20
3α-Hydroxy-5α-Pregnan-20-on	9 ± 7
Pregnandione:	
5β-Pregnan-3.20-Dion	29 ± 9
5α-Pregnan-3.20-Dion	0 ± 3
Pregnandiole:	
5β-Pregnan-3β.20α-Diol	288 ± 81
5β-Pregnan-3α.20α-Diol	21 ± 13
C_{17}-Steroide:	
5α-Androstan-17β-ol-3-on	50 ± 15
5β-Dihydrotestosteron	176 ± 27
Glucocorticoide (nur je eine Messung):	
Hydrocortison	10
Cortison	10
Corticosteron	12
Dexamethason	0
Betamethason	0

1) 100% Aktivität (0% Aktivierung) in Gegenwart von Methanol allein.

2) Mittelwerte der Aktivierung ($S \pm \bar{x}$) drei verschiedener 6β⁻-Formen 3b aus Lebern je eines einzelnen IIIVO/J-Kaninchens (außer Glucocorticoide).

TABELLE 9: Aktivierung der 16α-Hydroxylierung von Progesteron durch verschiedene Steroide in Gegenwart von 6β⁻-Form 3b und NADPH. Messung im Rekonstituierten System (vgl. "Methoden"). Substratkonzentration 7 µM, Effektorkonzentration 10 µM, Methanol-Endkonzentration 1%.

Gemäß diesen Erfordernissen ist die am stärksten aktivierende Verbindung 5ß-Pregnan-3ß.20α-Diol, wogegen 3α-Hydroxy-5α-Pregnan-20-on, von den beiden synthetischen Glucocorticoiden abgesehen, wie erwartet am schwächsten wirkt.

Die Wirkung der aktivierenden Verbindungen strebt mit steigender Konzentration einem Sättigungswert zu. Dies ist in Abbildung 23 für 5ß-Pregnan-3ß.20α-Diol dargestellt. Die halbmaximale Stimulation der 16α-Hydroxylierung von Progesteron in Gegenwart von 6ß$^-$-Form 3b ist bereits bei 5 µM Effektor-Konzentration erreicht. Diese Konzentration ist viel niedriger, als sie normalerweise für positive Effektoren "Cytochrom P-450"-katalysierter Reaktionen benötigt werden (56,62,63,123). Effektor-Konzentrationen, die die Substrat-Konzentrationen bis zum Fünffachen überstiegen (z.B. 50 µM vs. 10 µM, ohne Darst.), wirkten überdies nicht hemmend.

Diese Beobachtungen, sowie die Strukturabhängigkeit der Wirkung sprechen dafür, daß es sich bei dieser Aktivierung um einen spezifischen Effekt handelt, zu dessen Erklärung eine dritte Ligandenbindungsstelle in 6ß$^+$-Form 3b bzw. eine zweite in 6ß$^-$-Form 3b angenommen werden muß ("Zentrum 3"). Nach Bindung an dieses Zentrum erhöht der Aktivator die Vmax oder erniedrigt die Km des im niederaffinen Zentrum 2 gebundenen Substrates.

Die Lineweaver-Burk-Auftragung von Meßwerten der 16α-Hydroxylierung durch 6ß$^-$-Form 3b in Gegenwart einer sättigenden Konzentration des besten Aktivators (5ß-Pregnan-3ß-20 -Diol) zeigt Abbildung 24. Zum direkten Vergleich sind nochmals die Meßpunkte für den schon aus Abschnitt D.2.5. bekannten Effektor 16α-Methylprogesteron eingezeichnet. 5ß-Pregnan-3ß.20α-Diol aktiviert die 6ß$^-$-Form 3b etwa doppelt so stark wie 16α-Methylprogesteron. Der aktivierende Effekt läßt sich enzymkinetisch jedoch lediglich als eine Vergrößerung des Vmax/Km - Verhältnisses, also der Reaktionskonstante 1. Ordnung (97) beschreiben, weil für keinen dieser Parameter aus den auf Seite 49 u. 68 dargelegten Gründen (ungenügende Substratlöslichkeit, positive Kooperativität) ein exakter Zahlenwert in Abwesenheit des Aktivators angegeben werden kann.

Analoge Lineweaver-Burk-Auftragungen wurden auch für alle anderen, allerdings schwächeren Aktivatoren erhalten. Allen gemeinsam war auch das Verschwinden der in Gegenwart von Progesteron und 6ß$^-$-Form 3b beobachteten positiven Kooperativität (s.S. 68), sobald ein Aktivator anwesend war.

Die strukturelle Ähnlichkeit der in Tabelle 9 aufgeführten Verbindungen mit dem in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchten Substrat Progesteron legt nahe, daß die eine oder andere dieser Verbindungen auch selbst Substrat für eine der beiden

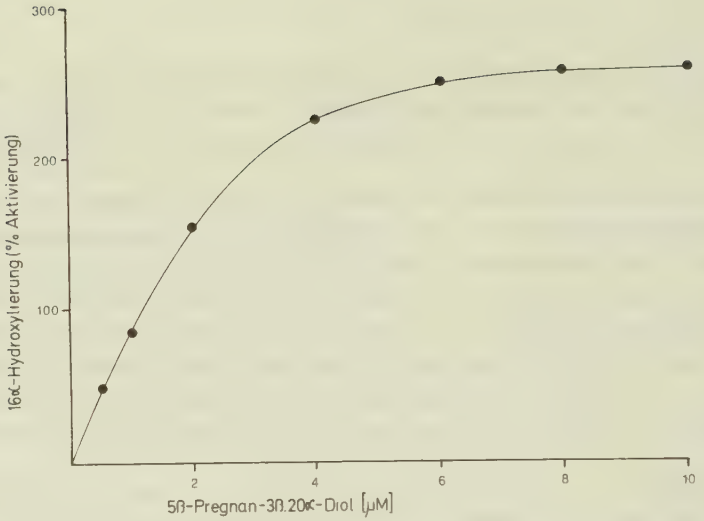


ABBILDUNG 23: Aktivierung der 16α-Hydroxylierung von Progesteron in Gegenwart einer beispielhaften 6ß⁻-Form 3b und NADPH imRekonstituierten System durch 5ß-Pregnan-3ß.20α-Diol. Abhängigkeit des Aktivierungsgrades von der Konzentration des Aktivators. Die Kontrollaktivität (0% Aktivierung) betrug 0.5mU/nMol P-450,die Substrat-Konzentration war 7 µM.

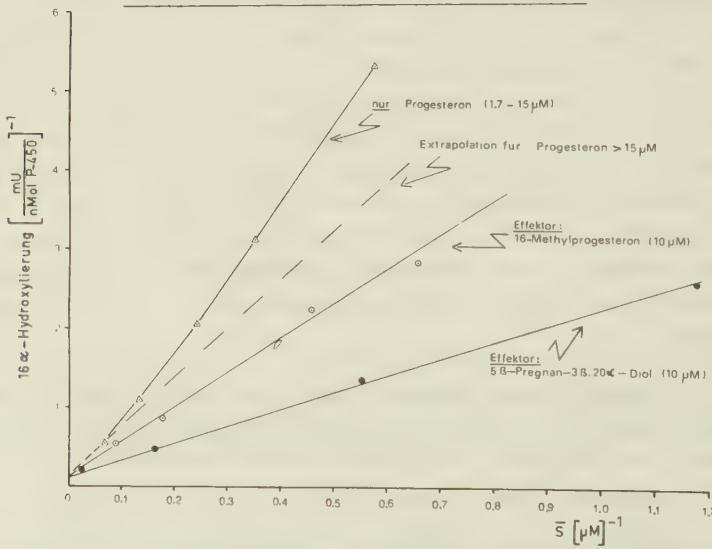


ABBILDUNG 24: Aktivierung der 16α-Hydroxylierung von Progesteron in Gegenwart einer beispielhaften 6ß⁻-Form 3b und NADPH im Rekonstituierten System durch Substrat (▲ ;Vergleich mit ----),16α-Methylprogesteron (⊙) oder 5ß-Pregnan-3ß.20α-Diol (●). Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Substrat-Konzentration (Auftragung n.Lineweaver-Burk).

Form 3b-Varianten sein könnte. Wie bereits erwähnt, war diese Möglichkeit allerdings für die 6ß⁻-Form 3b und hohe Substrat-Konzentrationen unwahrscheinlich, da sich unter solchen Bedingungen keine Hemmung der niederaffinen 16α-Hydroxylierung hatte nachweisen lassen. Damit ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß einer der Aktivatoren für 6ß⁻-Form 3b und erst recht für 6ß⁺-Form 3b nicht doch ein Inhibitor ist, zumal sich an 6ß⁺-Form 3b Aktivierung und Inhibierung durch 16α-Methylprogesteron (Abbildung 19) in denselben Konzentrationsbereichen von Substrat und Effektor abspielen.

Noch komplexer als mit 16α-Methylprogesteron als Effektor stellt sich z.B. die Dixon-Auftragung dar für die Hemmung/Aktivierung der hoch/niederaffinen 16α-Hydroxylierung durch 6ß⁺-Form 3b in Gegenwart eines mittleren Aktivators aus Tabelle 9, 20α-Hydroxy-5ß-Pregnan-3-on (Abbildung 25).

In Abhängigkeit von Substrat- und Effektor-Konzentration setzen sich die Kurven (Darstellung nach Dixon) jeweils aus einem aktivierten und einem gehemmten Anteil zusammen. Innerhalb jeder Kurve wird die geringste, aus der Additivität beider Anteile resultierende Aktivität bereits bei 2.5 µM Effektor gemessen, im Gegensatz zu ca. 10 µM bei 16α-Methylprogesteron (Abbildung 17). Verglichen damit ist 20α-Hydroxy-5ß-Pregnan-3-on also ein besserer Inhibitor des hochaffinen Zentrums 1, möglicherweise aber auch ein besserer Aktivator von Zentrum 2, oder beides.

Daß mindestens die erste dieser Möglichkeiten zutrifft, zeigt noch deutlicher die Hemmung der 6ß-Hydroxylierung durch diese Verbindung: Die K_i liegt jetzt, obwohl dieses und auch die anderen reduzierten Steroide aus Tabelle 9 weniger strukturelle Gemeinsamkeiten mit Progesteron teilen als 16α-Methylprogesteron, sogar unter 1.0 µM (Abbildung 26), die Vmax dagegen ist nach wie vor unbeeinflußt (kompetitive Hemmung).

In Gegensatz zur 16α-Hydroxylierung in Gegenwart der 6ß⁺-Form 3b (Abbildung 25) läßt sich dieselbe, jetzt durch 6ß⁻-Form 3b katalysierte Reaktion durch 20α-Hydroxy-5ß-Pregnan-3-on bei denselben Substrat- und Effektor-Konzentrationen wie erwartet lediglich aktivieren (Abbildung 27), und zwar durchschnittlich bis zum Zweifachen des Kontrollwertes.

Der beste Aktivator aus Tabelle 9, das "Diol" 5ß-Pregnan-3ß.20α-Diol, hemmte überraschenderweise die 6ß-Hydroxylierung durch 6ß⁺-Form 3b nicht (ohne Darst.). Damit verhielt sich diese Verbindung ganz anders als die soeben etwas ausführlicher untersuchte 3-Ketoverbindung. Beide aktivieren jedoch die 16α-Hydroxylierung durch die 6ß⁺-Variante, wie bereits die Abbildung 23 und 25 gezeigt haben. Der Aktivierungs-

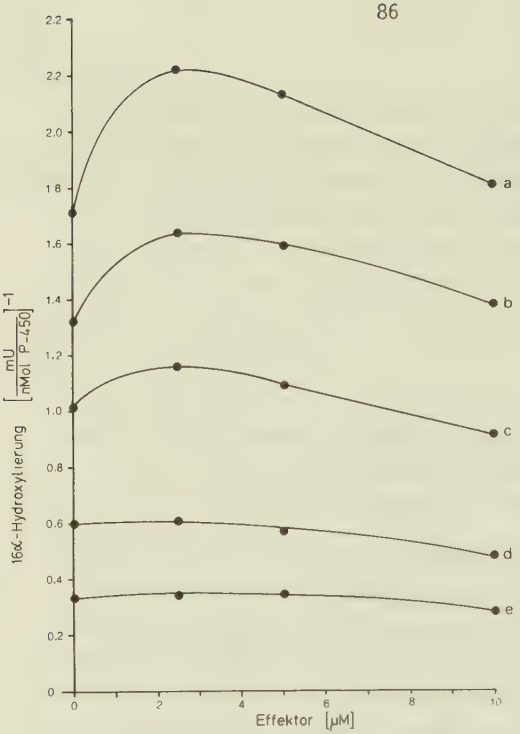
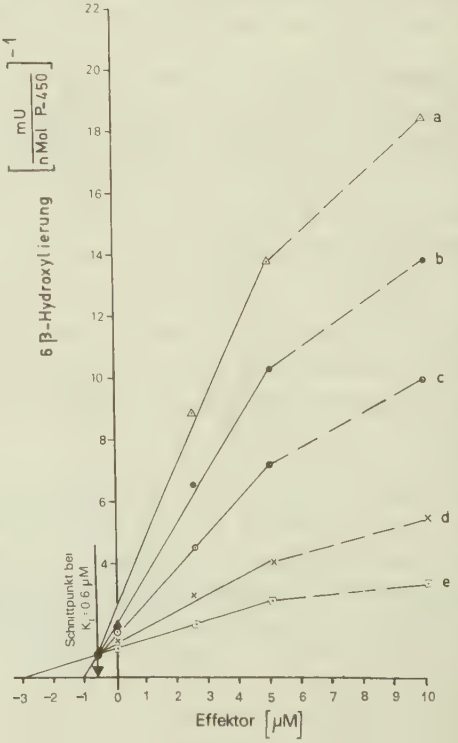


ABBILDUNG 25 (links):

Beeinflussung der 16α-Hydroxylierung von Progesteron in Gegenwart einer beispielhaften 6β$^+$-Form 3b und NADPH im Rekonstituierten System durch 5β-Pregnan-3β-ol-20-on: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von Substrat- und Effektor-Konzentration (Auftragung n. Dixon). Die Reaktion setzt sich in allen Kurven aus einem aktivierten ([Effektor] ≥ 2.5 μM) und einem gehemmten Anteil ([Effektor] ≤ 2.5 μM) zusammen. Substrat-Konzentrationen a-e: s. Abb.27, Seite 87

ABBILDUNG 26 (rechts):

Hemmung der 6β-Hydroxylierung von Progesteron in Gegenwart einer beispielhaften 6β$^+$-Form 3b und NADPH im Rekonstituierten System durch 5β-Pregnan-3β-ol-20-on. Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von Substrat- und Effektor-Konzentration (Auftragung n. Dixon). Der Kurvenverlauf ist bis 5 μM Effektor linear (darüber: beginnende Sättigung). Substrat-Konzentrationen a-e: s. Abb.27, Seite 87.



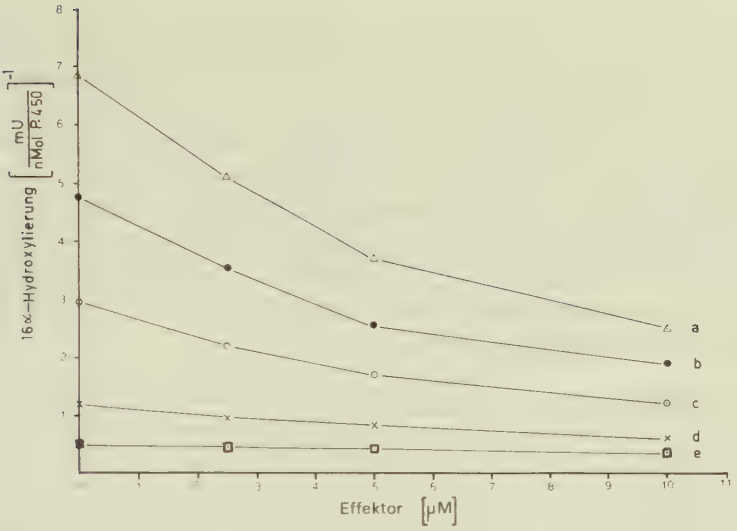


ABBILDUNG 27: Aktivierung der 16α-Hydroxylierung von Progesteron in Gegenwart einer beispielhaften 6β⁻-Form 3b u. NADPH im Rekonstituierten System durch 5ß-Pregnan-3ß-ol-20-on. Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von Substrat- und Effektor-Konzentration (Auftragung n. Dixon). Im Gegensatz zu Abb.25 zeigt sich lediglich eine Aktivierung.

Substrat-Konzentrationen a-e:
a: 2.5 µM; b: 3.33 µM; c: 5.0 µM; d: 10 µM; e 20 µM.

faktor des "Diols" war allerdings in Gegenwart der 6β$^+$-Variante nur halb so groß wie in Gegenwart der 6β$^-$-Variante, wo er fast vier betragen hatte.

Die Tatsache, daß das "Diol", im Gegensatz zu seinem 3-Ketoanalogen, die hochaffine 6β-Hydroxylierung überhaupt nicht hemmte, wohl aber die 16α-Hydroxylierung am besten von allen in Tabelle 9 aufgeführten Verbindungen aktivierte, zeigt, daß sich die strukturellen Erfordernisse an die Inhibitoren der hochaffinen katalytisch aktiven Bindungsstelle (Zentrum 1 in 6β$^+$-Form 3b) von den Erfordernissen an die Aktivatoren der niederaffinen Bindungsstelle (Zentrum 2) in 6β$^+$- oder 6β$^-$-Form 3b erheblich voneinander unterscheiden müssen.

Durch Auffindung der in diesem Abschnitt vorgestellten allosterischen Effektoren beider Form 3b-Varianten ist also nicht nur die Wahrscheinlichmachung eines weiteren (allosterischen) Zentrums 3 in beiden Varianten gelungen. Vielmehr haben diese Effektoren es auch ermöglicht, die Zentren 1 und 2 in funktioneller Hinsicht noch schärfer als in D.2.4. voneinander abzugrenzen und somit deren Existenz experimentell zusätzlich abzusichern. Dabei genügten nur einige der gefundenen Liganden den strukturellen Erfordernissen beider Zentren gleichzeitig. Dies spricht für die hohe Spezifität der vorliegenden Enzym-Ligand-Beziehungen. Die folgenden Ausführungen zeigen, daß weniger spezifische Wechselwirkungen, etwa mit der weitgehend Substrat-unspezifischen Cytochrom P-450-Reduktase, tatsächlich keine Rolle zu spielen scheinen:

Huang et al. (123) stellten fest, daß 7.8-Benzoflavon und Flavon, beides starke Stimulatoren der Hydroxylierung von Benz(a)pyren in Gegenwart von Kaninchenlebermikrosomen, in vitro dadurch aktivierend wirken, daß sie die zur Erreichung der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit benötigte Konzentration an Reduktase, also ihre Km, im Rekonstituierten System verringern, bzw. ihre Bindungsfestigkeit an den Cytochrom P-450/Substrat - Komplex erhöhen. Ähnliche Beobachtungen machten sie für gereinigte Human- oder Hamster-Cytochrom P-450 - Isoformen, nicht jedoch für P-450 - Isoformen aus Meerschweinchen oder Ratte.

Wie Abbildung 28 zeigt, trifft diese Art der möglichen Aktivierung auch auf P-450 - Isoformen aus Kaninchenleber nicht immer zu: In Gegenwart des stärksten Aktivators aus Tabelle 9 und 6β$^-$-Form 3b unterscheidet sich der Km-Wert der Reduktase nicht von demjenigen in Abwesenheit des Aktivators; in Gegenwart von 0.1 nMol 6β$^-$-Form 3b beträgt er in beiden Fällen 0.08 U (= 0.027 μM bei V_t = 1 mL). In dieser Darstellung äußert sich die Aktivierung vielmehr als eine Erhöhung des Vmax-Wertes der Reduktion des Enzym/Substrat - Komplexes durch die Reduktase: zur Erreichung gleicher Reaktionsgeschwindigkeiten werden in Gegenwart eines guten Aktivators (Abb.28) wesentlich geringere Reduktase-Mengen benötigt als in seiner Abwesenheit. Dies aber

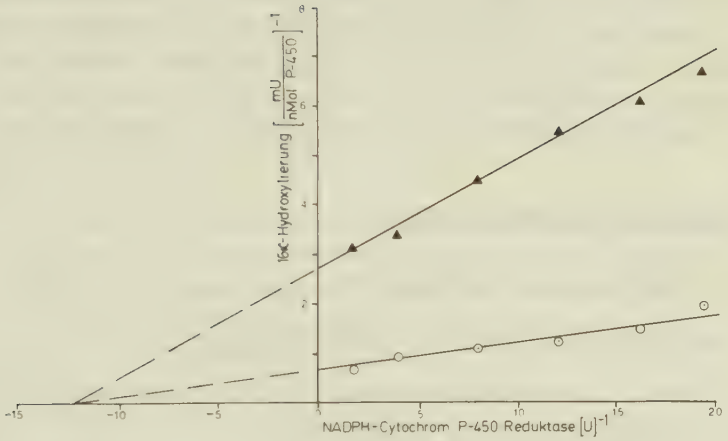


ABBILDUNG 28: 16α-Hydroxylierung von Progesteron in Gegenwart einer beispielhaften 6β⁻-Form 3b und NADPH im Rekonstituierten System. Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Konzentration an Cytochrom-P-450 - Reduktase und der An- oder Abwesenheit von 5β-Pregnan-3β.20α-Diol (Auftragung n.Lineweaver-Burk).

Substrat-Konzentration: 10 µM;
Geschlossene Symbole: 0 µM 5β-Pregnan-3β.20α-Diol;
Offene Symbole: 10 µM 5β-Pregnan-3β.20α-Diol.

nicht etwa deshalb,weil die Reduktase - wie im Fall der Flavon-vermittelten Aktivierung - nun besser an 6β⁻-Form 3b binden würde. Vielmehr muß sich die Spezifität der Pregnan-vermittelten Aktivierung auf deren Wechselwirkungen mit dem allosterischen Zentrum 3 (s.S. 108/9) einerseits und der Wechselwirkung des Substrates mit Zentrum 2 andererseits beziehen. Ihre kompetitiv hemmende Wirkung muß dagegen an Zentrum 1 direkt angreifen. Man kann annehmen, daß sich bei der Vielzahl dieser Möglichkeiten nicht nur die Vmax, sondern auch die Km verändert (vgl. jedoch Absatz 3, Seite 83).

D.3 Ergebnisse chemischer Methoden

D.3.1. Affinitätsmarkierung von 6β⁻-Form 3b

1. Eingesetzter Affinitätsmarker: 16α-[α-^{3}H]-Brom Acetylprogesteron.

In diesem Abschnitt wird die Anwesenheit des in D.2.6. enzymkinetisch wahrscheinlich gemachten allosterischen Zentrums 3 mit Hilfe einer hiervon unabhängigen chemischen Methode, der Affinitätsmarkierung, nachgewiesen. Zu diesem Zweck war ein radioaktives Strukturanaloges des Substrates Progesteron zu synthetisieren, das eine der beiden Form 3b-Varianten radioaktiv und kovalent zu markieren imstande war.

Die Wahl fiel auf 16α-[α-^{3}H]-Bromacetylprogesteron (16α-[α-^{3}H]-BrAcP) als Strukturanaloges sowohl von Progesteron wie von 16α-Methylprogesteron. Letzteres wirkt auf Form 3b je nach Variante als Inhibitor und/oder Aktivator (III.D.2.4.). Ein ähnliches Verhalten (unter gleichzeitiger Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen der reaktiven Bromacetylgruppe und einem der 3 (2) Bindungszentren von Form 3b) war auch von [^{3}H]-BrAcP zu erwarten.

Die Synthese von [^{3}H]-BrAcP erfolgte in drei Schritten (s. Methoden). Die in (110) angegebene Reinigungsmethode wurde von mir durch einen säulenchromatographische Schritt und eine weniger verlustreiche Kristallisation verbessert, wodurch sich Ausbeute und Reinheit erhöhten. Das Endprodukt enthielt insgesamt 0.04 bis 0.5% Verunreinigungen unbekannter Struktur, von denen im Konzentrationsbereich 10-15 µM jedoch keine der beiden Form 3b-Varianten gehemmt und/oder aktiviert wurde. In diesem Konzentrationsbereich zeigte lediglich das durch HPLC gereinigte oder nicht gereinigte Hauptprodukt [^{3}H]-BrAcP die erwarteten Wirkungen auf die 16α-Hydroxylierung von Progesteron. Es wurde deshalb in alle Experimente ohne vorherige Reinigung durch HPLC eingesetzt. Nähere Angaben zur Stabilität von [^{3}H]-BrAcP unter Test-relevanten Bedingungen und seine Reaktion mit SH-haltigen Reagentien finden sich im methodischen Teil.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Versuche waren die Verwendung von Äthanol (nicht Methanol wie im Fall von [4-^{14}C]-Progestern) für Stammlösungs-Verdünnungsreihen sowie von Glutathion als Abfangreagenz für nicht mit dem Enzym in Reaktion getretene Überschüsse von [^{3}H]-BrAcP in Inkubation zur kovalenten Markierung.

2. [^{3}H]-BrAcP als enzymkinetischer (reversibler) Inhibitor und Aktivator beider Form 3b - Varianten.

Ziel dieser Versuche war es, herauszufinden, ob zwischen den katalytischen und dem vermuteten Zentrum 3 der beiden Form 3b-Varianten und [^{3}H]-BrAcP eine enzymkinetisch beschreibbare Wechselwirkung, vergleichbar derjenigen beider Varianten mit 16α-Methylprogesteron (D.2.4.) oder den reduzierten Steroiden (D.2.6.), bestand, Nur dann erschien es sinnvoll, eine eventuelle kovalente Bindung von [^{3}H]-BrAcP an eines dieser Zentren zu untersuchen.

Die Versuchsbedingungen wurden so gewählt,daß Störungen der Aktivitätstests durch evtl. kovalent gebundenes [^{3}H]-BrAcP keine Rolle spielten[1].

a) [^{3}H]-BrAcP als reversibler Inhibitor von 6β^{+}-Form 3b:

In Konzentrationen von 1 - 10 μM hemmte [^{3}H]-BrAcP die 6β-Hydroxylierung von Progesteron durch 6β^{+}-Form 3b kompetitiv. Die kinetische Hemmkonstante betrug ca. 2 μM. Damit verhielt sich diese Verbindung praktisch identisch wie 16α-Methylprogesteron, für das in III.D.2.4. eine K_i von ca. 1 μM für die durch die 6β^{+}-Form katalysierte 6β-Hydroxylierung gemessen worden war (Abbildung 19).

b) [^{3}H]-BrAcP als reversibler Aktivator von 6β^{-}-Form 3b:

Ähnlich wie 16α-Methylprogesteron oder die reduzierten Steroide aus III.D.2.5. aktivierte auch [^{3}H]-BrAcP die 16α-Hydroxylierung von Progesteron durch 6β^{-}-Form 3b. Die hierfür erforderlichen Effektor-Konzentrationen waren jedoch wesentlich höher. Das Maximum der Aktivierung war mit 50 μM [^{3}H]-BrAcP noch nicht erreicht (vgl. dagegen Abbildung 23).

Auf Grund dieser kinetischen Daten war also weder eine irreversible Inaktivierung noch eine irreversible Aktivierung einer der beiden Form 3b-Varianten durch kovalenten Einbau von [^{3}H]-BrAcP von vornherein auszuschließen. Erstere erschien allerdings wahrscheinlicher als letztere.

---

1) Höchstens 5 Minuten Inkubationszeit in Ggwt. eines höchstens 100-fachen molaren Überschusses an [^{3}H]-BrAcP. Der Vergleich mit den Daten in III.D.3.1.3 und III.D.3.1.4. zeigt,daß damit die oben genannte Forderung erfüllt war.

3. [^{3}H]-BrAcP als irreversibler Inaktivator von 6β$^+$-Form 3b:

Die zeitabhängige Inaktivierung wurde benötigt als notwendiger, jedoch nicht hinreichender Nachweis für den spezifischen kovalenten Einbau von [^{3}H]-BrAcP in Zentrum 1 oder 2 (6β$^+$-Form 3b) oder in Zentrum 2 (6β$^-$-Form 3b). Eine zeitabhängige (irreversible) Inaktivierung von 6β$^+$-Form 3b ließ sich lediglich in Gegenwart eines mindestens 300-fachen molaren Überschusses von [^{3}H]-BrAcP über das Enzym nachweisen. Die Inkubationszeit mußte zur Erreichung von wenigstens 20% Kontrollaktivitätsverlust mindestens 20 Minuten betragen. Die Spezifität dieser Inaktivierung war unwahrscheinlich, da zwar Bromessigsäure, nicht aber das Substrat Progesteron (± NADPH) das Enzym vor dieser zeitabhängigen Inaktivierung schützte (ohne Darst.).

Ähnliche Versuche bei pH 6 und 9 lieferten dasselbe Ergebnis, obwohl mir aus unabhängig davon durchgeführten Experimenten bekannt war, daß bei pH 6.0 das Substrat um etwa den Faktor 6 besser band und bei pH 9.0 die Vmax nur etwa 1/7 ihres Wertes bei pH 7.4 besaß (bessere Produktbindung). Daraus war die Schlußfolgerung zu ziehen, daß die zeitabhängige Inaktivierung von 6β$^+$-Form 3b durch [^{3}H]-BrAcP unspezifisch war.

Das Ausbleiben einer spezifischen Inaktivierung könnte dadurch erklärt werden, daß die 16α-ständige Seitenkette des Effektors dessen Bindung an das Enzym nicht behindert und er eben deshalb,und genauso wie 16α-Methylprogesteron, ein so guter reversibler Inhibitor (Substrat-Analoges) von Zentrum 1 ist.

4. [^{3}H]-BrAcP als irreversibler Aktivator von 6β$^-$-Form 3b:

In dieser Versuchsreihe wurden Bedingungen gesucht, unter denen sich 6β$^-$-Form 3b in Gegenwart von [^{3}H]-BrAcP durch dessen kovalente Bindung an das vermutete allosterische Zentrum 3 zeitabhängig (irreversibel) aktivieren ließ. Die Vorbemerkung zum vorigen Absatz (D.3.1.3., Satz 1) gilt entsprechend. Wegen der einfacheren enzymkinetischen Verhältnisse wurde nur 6β$^-$-Form 3b untersucht.

Das Ergebnis der Koinkubation von 0.5 µM Enzym mit 50 µM [^{3}H]-BrAcP zeigt Abbildung 29. 6β$^-$-Form 3b läßt sich durch [^{3}H]-BrAcP zeitabhängig um bis zu 60% aktivieren. Genau parallel dazu verläuft der Einbau von Radioaktivität aus dem Aktivator-Analogen (s. nächster Absatz, D.3.1.5.). Der Spezifitätsnachweis für die permanente Aktivierung von 6β$^-$-Form 3b durch [^{3}H]-BrAcP gelang insofern, als sie durch Bromessigsäure bei einem bezüglich [^{3}H]-BrAcP bis zu 3-fachen molaren Überschuß nicht verhindert oder verringert wurde (ohne Darst.).

Die Verwendung eines der in D.2.6. behandelten, reversibel bindenden reduzierten Steroide als spezifischer Kompetitor für [^{3}H]-BrAcP um Zentrum 3 war wegen der beschränkten Löslichkeit dieser Verbindung in wässrigem Puffer nicht möglich.

Das niedrige molare Einbauverhältnis (s. Abbildung 29 und D.3.1.5.) und die Unbeeinflußbarkeit der permanenten Aktivierung des Enzyms durch Bromessigsäure (unspezifisches Reaktions-, jedoch nicht Struktur-Analoges), lassen den Schluß zu, daß diese permanente Aktivierung von 6ß$^{-}$-Form 3b eine direkte Folge der kovalenten Markierung von Zentrum 3 durch [^{3}H] -BrAcP ist. Eine kovalente Markierung von Zentrum 2 oder 1 hätte in beiden Form 3b-Varianten nur zu einer permanenten Inhibierung führen können. Damit war die Anwesenheit des allosterischen Zentrums 3 in 6ß$^{-}$-Form 3b definitiv bewiesen. Dasselbe Zentrum muß auf Grund der Daten von D.2.4. und D.2.6. auch in 6ß$^{+}$-Form 3b anwesend sein.

5. Nachweis und Quantifizierung des kovalenten Einbaus von [^{3}H] -BrAcP in 6ß$^{-}$-Form 3b.

6ß$^{-}$-Form 3b wurde wie in Abbildung 29 beschrieben 3 Stunden lang mit [^{3}H]-BrAcP koinkubiert und die Reaktion mit 5 mM Glutathion abgebrochen. Die Abtrennung des Enzyms von nicht eingebauter Radioaktivität erfolgte nach verschiedenen Methoden (Fällung mit Trichloressigsäure; Präzipitation des Enzyms mit Hilfe eines trägergebundenen monoclonalen Antikörpers; erschöpfende Dialyse).

Alle drei Methoden lieferten molare Einbauverhältnisse, bezogen auf Protein (Molekulargewicht: 51000 $\pm$ 500) zwischen 0.5 und 1.5. In Kontroll-Ansätzen mit Form 1 konnte kein kovalenter Einbau von Radioaktivität nachgewiesen werden.

Eine Überprüfung der Korrelation des Einbauverhältnisses mit dem Ausmaß der permanenten Aktivierung war nur nach erschöpfender Dialyse (keine Denaturierung) möglich. Beide Parameter nehmen genau parallel zu (Abbildung 29). Ähnlich wie die permanente Aktivierung erreicht auch das molare Einbauverhältnis sein Maximum nach 3 Stunden Inkubationszeit. Es ließ sich durch die gleichzeitige Anwesenheit von Bromessigsäure nicht beeinflussen (ohne Darst.). Der schwache Abfall von Einbauverhältnis und Aktivität zwischen 3 und 10 Stunden Inkubationsdauer ist nicht bewertbar, da das Enzym unter diesen Bedingungen auch in den Kontrollansätzen Aktivität verlor.

Das Vorliegen einer kovalenten Bindung zwischen [^{3}H] -BrAcP und 6ß$^{-}$-Form 3b wurde quantitativ zusätzlich dadurch bewiesen, daß sich das nach der erschöpfenden Dialyse in der Enzymlösung verbliebene Tritium durch organische Lösungsmittel (Methanol,

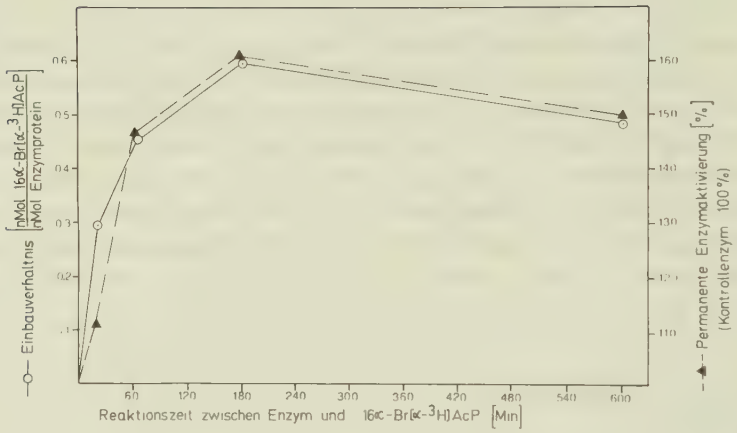


ABBILDUNG 29: Irreversible Aktivierung von 6β-Form 3b durch kovalenten Einbau von Tritium aus 16α-[α-^{3}H]-Bromacetylprogesteron.

5 nMol Enzym wurden mit 500 nMol 16α-[α-^{3}H]-Bromacetyl= progesteron bei 20°C in 10 ml KPi/20% Glycerin zur Reaktion gebracht (s."Methoden"). Nach Reaktionsabbruch durch Zugabe von 5 mM Glutathion und Dialyse über 4 Tage gegen 4 x 6 L KPi /20% Glycerin wurden Progesteron-16α-Hydroxylierung, Radioaktivität ([^{3}H]) und Protein bestimmt.

Butanol, Chloroform) nicht extrahieren ließ (ohne Darst.).

Zusammenfassend ist damit gezeigt, daß [^{3}H]-BrAcP kovalent in 6ß$^{-}$-Form 3b eingebaut wird. Als Bindungsort kommt, wie schon in D.3.1.4. gezeigt, nur das allosterische Zentrum 3 in Frage.

6. Versuche zur Identifizierung des markierten Strukturelements.

Diese Versuche werden zur Zeit von E.F. Johnson et al., La Jolla, USA, zu Ende geführt. An eigenen (vorläufigen) Ergebnissen sind zu nennen (Tabelle 10):

a) Die Auftrennung des tryptischen Hydrolysats (108) einer affinitätsmarkierten Enzympräparation (5 nMol) über HPLC ergab keine Anhaltspunkte dafür,daß sich das markierte Strukturelement in einem derjenigen Bereiche des Enzymmoleküls befand,die der proteolytischen Spaltung durch Trypsin zugänglich sind. Fast 40% der enzymgebundenen Radioaktivität verblieb als NaOH-löslicher,ca. 27% als Methanol/Chloroform - löslicher Rückstand auf dem zur Abtrennung größerer Spaltprodukte vor der HPLC routinegemäß eingeschalteten Ultrafilter zurück.

b) Der lösliche Überstand des Total-Hydrolysats einer [^{3}H]-markierten Enzympräparation enthielt ebenfalls keine Radioaktivität. Die eingesetzten cpm wurden aber fast quantitativ als Chloroform-löslicher Rückstand des HCl-sauren Hydrolysats im Aufschlußröhrchen wiedergefunden.

Aus a) und b) war zu folgern, daß das Enzym (6ß$^{-}$-Form 3b) durch [^{3}H]-BrAcP an einer extrem hydrophoben Stelle des Moleküls markiert worden war. Der interessierende Strukturbereich entzog sich deshalb den bisher üblichen Aufschlußmethoden gereinigter P-450 - Isoformen.

Erst in allerletzter Zeit ist es an Isoform 2 aus Kaninchenleber gelungen, auch extrem hydrophobe Bereiche der Polypeptidkette in die Primärstrukturanalyse mit einzubeziehen (124).

D.3.2. Vergleich proteolytisch erzeugter Peptidmuster von 6ß$^{+}$- und 6ß$^{-}$-Form 3b

Die bis hierher lediglich enzymkinetisch voneinander unterschiedenen beiden Form 3b-Varianten sollen jetzt noch mit Hilfe zweier verschiedener und in der Proteinchemie gut eingeführter Methoden der Peptidkartierung nach proteolytischer Spaltung miteinander verglichen werden.

Arbeitsschritt Nr.	Aufschlußmethode 1 (vgl. 101): Tryptische Verdauung einer [^{3}H]-markierten 6β$^-$-Form 3b und HPLC.		Aufschlußmethode 2: Total-Hydrolyse einer [^{3}H]-markierten 6β$^-$-Form 3b in 6N HCl (24h,110°C).	
	Art des Arbeitsschrittes:	[^{3}H]-Gesamtaktivität im Arbeitsschritt:	Art des Arbeitsschrittes:	[^{3}H]-Gesamtaktivität im Arbeitsschritt:
1 (Ausgangsmaterial)	Tryptisch proteolysierte, [^{3}H]-markierte 6β$^-$-Form 3b	257000 cpm (100%)	Lyophylisierte, [^{3}H]-markierte 6β$^-$-Form 3b	35200 cpm (100%)
2	Peptid-Auftrennung durch HPLC, Frktt. 49-51	17000 cpm (6.7%)	Behandlung des Lyophylisats mit 6N HCl (s.o.)	keine [^{3}H]-Aktivität im Oberstand
3	In 2N NaOH löslicher Rückstand auf HPLC-Filter Extraktion Nr. 1 Extraktion Nr. 2 Extraktion Nr. 3	 72000 cpm (28%) 18500 cpm (7.2%) 6300 cpm (2.5%)	Lösung des Hydrolyse-Rückstandes in 2N NaOH	keine [^{3}H]-Aktivität im Oberstand
4	Behandlung des Filters aus Schritt 3 mit $CHCl_3$:CH_3OH (1:1)	68500 cpm (27%)	Behandlung des Rückstandes aus Schritt 3 mit CH_3OH	keine [^{3}H]-Aktivität im Oberstand
5	Rückstand im Reaktionsgefäß	6000 cpm (2.2%)	Behandlung des Rückstandes aus Schritt 3 mit $CHCl_3$	30000 cpm (85%)
	Summe:	190000 cpm (74%)	Summe:	30000 cpm (85%)

TABELLE 10: Kovalente Markierung von 6β$^-$-Form 3b mit [^{3}H]-BrAcP. Untersuchung proteolytischer/hydrolytischer Bruchstücke auf ihren Gehalt an kovalent gebundenem Tritium [^{3}H].

1. Elektrophorese

In der ersten Methode werden dem Vergleich die eindimensionalen, durch SDS-PAGE aufgetrennten Peptidmuster zugrunde gelegt, die durch Behandlung der zu vergleichenden Isoformen mit drei verschiedenen Proteasen (Staphylococcus aureus V8 - Protease, Papain, Chymotrypsin) entstehen. Abbildung 30 zeigt, daß alle drei Proteasen aus 6ß$^+$-Form 3b sowie aus 6ß$^-$-Form 3b (NZW) und 6ß$^-$-Form 3b (IIIVO/J) dieselben Peptide freizusetzen scheinen. Die Bedingungen dieses Experiments waren so gewählt, daß in einem weiten Zeit- und Konzentrationsbereich reproduzierbare Peptidmuster für jede Form erhalten wurden. Unter dieser Voraussetzung war diese Methode z.B. mit Erfolg dazu benutzt worden, elektrophoretisch voneinander trennbare P-450 - Isoformen bezüglich ihrer Primärstruktur eindeutig gegenseitig abzugrenzen (81, 125).

Zur Differenzierung von 6ß$^+$- und 6ß$^-$-Form 3b lieferte die Methode jedoch keinen anderen auswertbaren Beitrag als den, daß sich die Primärstrukturen beider Varianten offensichtlich zu ähnlich sind, um mit dieser Methode unterschieden werden zu können.

2. HPLC

Mehr Erfolg wurde mit der zweiten Methode erzielt. Sie bestand in der Auftrennung der durch extensive Behandlung mit Trypsin erhaltenen Peptidmischung durch HPLC in umgekehrter Phase. Diese Vorgehensweise war von Ozols et al. (108) zum Nachweis ausgeprägter struktureller Unterschiede zwischen den P-450 - Isoformen 2 und 3b benutzt worden.

Repräsentative Chromatogramme für je eine 6ß$^+$- und eine 6ß$^-$-Präparation zeigt Abbildung 31. Grob gesehen sind die beiden Chromatogramme in fast jeder Hinsicht identisch. Kleine Unterschiede bestehen jedoch einmal zwischen den Ausbeuten verschiedener Peptide (Einzelpeaks); Unterschiede dieser Art traten aber auch beim Vergleich mehrerer Chromatogramme ein- und derselben Variante auf und können deshalb beim derzeitigen Kenntnisstand nicht als signifikant betrachtet werden. Zum andern unterscheiden sich beide Chromatogramme jedoch auf ihrer ganzen Länge durch An- bzw. Abwesenheit zahlreicher kleiner Peptide. Methodisch bedingte Grenzen von Auflösung und Empfindlichkeit verbieten es z.Zt. noch, diese Unterschiede eindeutig auf strukturelle Differenzen zwischen den beiden Form 3b-Varianten zurückzuführen. Ein einziges, etwas größeres Peptid dagegen, Nr. 14 in Abbildung 31, war regelmäßig zwar in 6ß$^+$-Form 3b, nie dagegen in der 6ß$^-$-Variante zu beobachten (Abbildung 32). Es ist in Abbildung 31 durch einen Pfeil kenntlich gemacht.

Diese genannten Unterschiede,besonders aber die Abwesenheit von Peptid 14 im Chromatogramm der 6ß⁻-Variante von Form 3b,sprechen stark dafür,daß sich die beiden Varianten tatsächlich primärstrukturell voneinander unterscheiden - trotz der Tatsache,daß sie sich durch SDS-PAGE nicht voneinander trennen lassen (Abb.16).

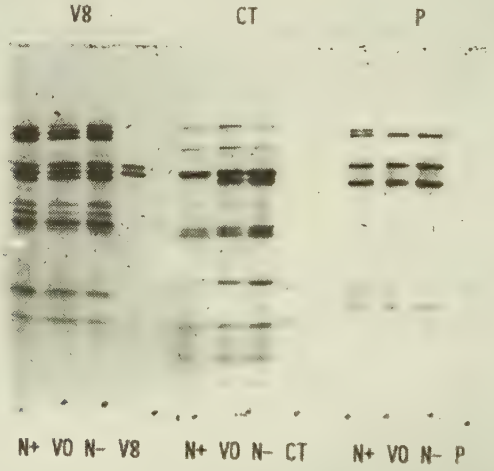


ABBILDUNG 30: Peptidkartierung durch Polyacrylamid (12%)/Schichtgel-Elektrophorese: Vergleich von Form 3b aus NZW- und IIIVO/J-Kaninchen nach limitierter Proteolyse durch je eine von 3 verschiedenen Proteasen. Die einzelnen Proteasen waren V_8: S.aureus V_8 Protease; CT: α-Chymotrypsin; P: Papain.

Markierung der Bahnen:

N^+: 6ß⁺-Form 3b aus NZW-Kaninchen;
N^-: 6ß⁻-Form 3b aus NZW-Kaninchen Nr. 24 (vgl. Tab.1a)
VO: 6ß⁻-Form 3b aus IIIVO/J-Kaninchen;
V_8,CT,P: Proteasen alleine (3.75; 1.0 oder 0.03 µg).

Experimentelle Durchführung: 7.5 µg der jeweiligen Form 3b-Variante werden während 30 Minuten bei 37°C mit einer der genannte genannten Proteasen in 0.1% SDS koinkubiert (107). Zur Durchführung der Elektrophorese vgl. Abb.15.

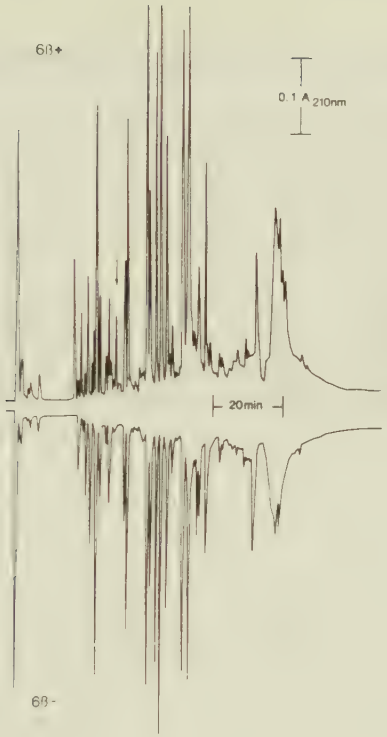


ABBILDUNG 31: Peptidkartierung durch HPLC: Vergleich von $6\beta^+$- und $6\beta^-$-Form 3b nach extensiver Proteolyse durch Trypsin. Das Chromatogramm der $6\beta^-$-Form wurde zur Erzielung einer besseren Vergleichbarkeit um 180^o gedreht. Die tryptischen Peptide aus ca. 4 nMol jeder Präparation wurden in umgekehrter Phase aufgetrennt (vgl. 108 und "Methoden",S.25). Das in $6\beta^-$-Form 3b nicht aufgefundene Peptid ist im Chromatogramm von $6\beta^+$-Form 3b durch einen Pfeil hervorgehoben.

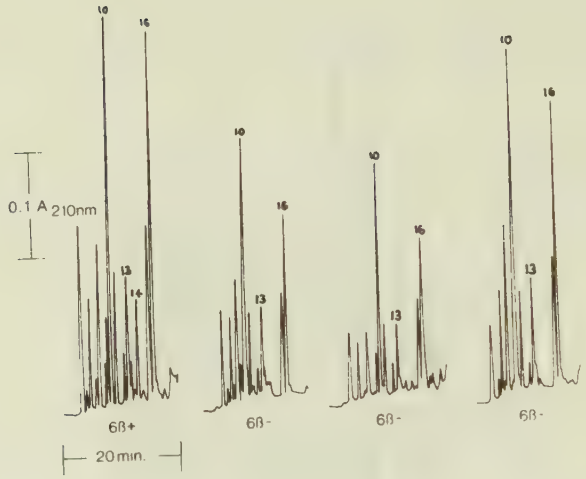


ABBILDUNG 32: Ausschnitt des durch HPLC erhaltenen Chromatogramms aus Abb.31 für eine $6\beta^+$- und drei $6\beta^-$-Formen im Bereich des fehlenden Peptids. Die Nummerierung der Peptide folgt dem Vorschlag in (108). Peptid 14 wurde regelmäßig in den meisten Form 3b-Präparationen von NZW-Kaninchen($6\beta^+$),nie jedoch in Präparationen aus IIIVO/J-Kaninchen ($6\beta^-$) beobachtet. Auch in der Präparation aus NZW-Tier Nr. 24 ($6\beta^-$; vgl. Tab. 1a) war Peptid 14 nicht aufzufinden.

IV. DISKUSSION

A. Hydroxylierung von Progesteron und Östradiol in Gegenwart von Form 1.

Diese Arbeit konnte eine früher geäußerte Vermutung, die hepatische Progesteron-21-Hydroxylierung laufe im Kaninchen ohne Beteiligung des mikrosomalen "Cytochrom P-450" ab (126), widerlegen. Auf mikrosomaler Ebene ist der diesbezügliche positive Nachweis darin zu sehen, daß ein spezifischer Antikörper gegen die Cytochrom P-450 - Reduktase diese (und andere) Hydroxylierung(en) fast vollständig hemmte (s.S.20).

Auf der Ebene der strukturellen Multiplizität des "Cytochrom P-450" konnte mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit gezeigt werden, daß in Lebermikrosomen, und damit auch vermutlich im Ganztier, nur Isoform 1 diese Hydroxylierung katalysiert. Hierfür sprechen vor allem die Ausschließlichkeit, mit der diese Isoform Progesteron in DOC umwandelt, aber auch die Tatsache, daß Präparationen aus 21h-Mikrosomen eine 2- bis 3-mal höhere spezifische 21-hydroxylierende Aktivität aufweisen als solche aus 21n-Mikrosomen (Abbildung 14), sowie die besseren Ausbeuten, mit denen Isoform 1 aus 21h-Mikrosomen erhalten werden kann.

Der definitive Nachweis für die Identität von Form 1 und mikrosomaler Progesteron-21-Hydroxylase in Kaninchenleber ist vor kurzem durch eine immunologische Technik erbracht worden: Sowohl die mikrosomale Progesteron-21-Hydroxylierung, als auch die Östradiol-2-Hydroxylierung, nicht aber die 6ß- und die 16α-Hydroxylierung, lassen sich durch den hochspezifischen (182), gegen Form 1 gerichteten monoclonalen Antikörper IF-11 (vgl. Fußnote S.29 und "Anlage", Tab.1+3, Seiten 142/143) fast vollständig hemmen (183-185).

Die Identifizierung von Form 1 als die hepatische Progesteron-21-Hydroxylase des Kaninchens gibt den Blick frei auf denkbare Modi der zellulären Regulation dieser Aktivität. Sie kommen in Tabelle 1 oder Abbildung 13 auf der mikrosomalen Ebene phänotypisch zum Ausdruck. Zwei sich möglicherweise überlappende Regulationsmodi bieten sich an:

1) Die Aktivität wird direkt über die endoplasmatische (mikrosomale) Konzentration an Form 1 gesteuert, vergleichbar etwa der hormonellen Steuerung anderer "Cytochrom P-450" - abhängiger Aktivitäten (vgl. EINLEITUNG, Seite 11).

Für diese Möglichkeit spricht die bereits erwähnte Tatsache, daß je nach mikrosomaler Quelle (21n oder 21h) Form 1 in verschieden hoher Ausbeute erhalten wurde.

Zwischen der funktionellen Einteilung der Mikrosomen (21n oder 21h) und der immunologisch mit Hilfe des monoclonalen Antikörpers IF-11 nachweisbaren Form 1-Menge besteht eine ausgezeichnete Übereinstimmung,und zwar sowohl hinsichtlich der Progesteron-21- wie der Östradiol-2-Hydroxylierung (183,184). Andererseits wurde durch SDS-PAGE in den Mikrosomen,unabhängig von ihrer Klassifizierung,immer dieselbe Menge an Form 1 gefunden (ohne Darst.). Die isolierten Form 1 - Mengen ihrerseits schwankten lediglich innerhalb eines Faktors von 3,und dies selbst bei Betrachtung von Präparationen,für die vor der Aufarbeitung noch bis zu 75-fache Aktivitätsdifferenzen nachgewiesen worden waren (vgl. Tabelle 1).

Auffallend war allerdings von vornherein die geringere spezifische Aktivität der Form 1 - Präparationen aus 21n-Mikrosomen für die Progesteron-21-Hydroxylierung (vgl. Abb. 14). Daraus,und aus den Beobachtungen des vorigen Absatzes läßt sich ableiten, daß die kleinstmögliche regulierbare Einheit der in 21-Stellung hydroxylierenden Aktivität möglicherweise nicht mit der elektrophoretischen Form 1 identisch ist, sondern lediglich in wechselnden Anteilen zusammen mit dieser isoliert wird. Der zweite mögliche Regulationsmodus dieser Aktivität ergibt sich unmittelbar:

2) Die Progesteron in 21-Stellung hydroxylierende Aktivität ist eine zu wechselnden Anteilen in Form 1 enthaltene "Subform" (Polypeptidkette) der elektrophoretischen Form 1 und sie wird als solche endogen reguliert.

Mit dieser Annahme wäre impliziert, daß die elektrophoretische Form 1 sowohl funktionell wie proteinchemisch, je nach Typisierung als 21n- oder 21h-Form 1, eine andere Protein- oder "Subformen"mischung darstellt.

Als zugrunde liegender Regulationsmodus käme ein Form 1-bezogener genetischer Polymorphismus in Frage (vgl. DISKUSSION zu Form 3b, S.123), der - grob eingeteilt zu mindestens den beiden in dieser Arbeit beschriebenen Stoffwechselsituationen (21h oder 21n) im Kaninchen führen würde. Für einen genetischen Polymorphismus sprechen auch die höheren,für Form 1 codierenden mRNA-Mengen,die sich aus der Leber von 21h-Tieren im Vergleich zu Lebern von 21n-Tieren isolieren lassen (185). Welche anderen (endogenen ?) Aktivitäten in der 21n- (21h-) Form 1 dagegen möglicherweise erhöht (erniedrigt) sind,ließ sich durch diese Arbeit nicht mehr klären.

Selbstverständlich können sich die beiden genannten Regulationsmodi auch gegenseitig überschneiden, z.B. durch hormonelle (endogene) Regulation der postulierten "Subform", oder in Form eines genetischen Polymorphismus bereits bei

der hormonellen Steuerung einer proteinchemisch möglicherweise doch homogenen Form 1. Ein Ansatzpunkt hierfür wäre die Aktivitäts-beeinflussende Modifikation proteingebundener Aminosäurereste,z.B. durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung in vivo (127).

Über die funktionellen Konsequenzen der 21h/21n - Multiplizität des "Cytochrom P-450" in vivo lassen sich hier nur einige Vermutungen anstellen. Sie betreffen die Geschlechtsspezifität,die hormonelle Wirksamkeit von DOC und den Fremdstoffwechsel.

Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression "Cytochrom P-450" - abhängiger mikrosomaler Monooxygenasen sind für die Ratte,kaum aber für andere Arten bekannt (49,50). Ab einem Lebensalter von 30 Tagen nimmt z.B. die mikrosomale Östradiol-2-Hydroxylierung in weiblichen Ratten ab,während sie in männlichen zunimmt (128). Zwischen Östrogenen und dem oxidativen und reduktiven Stoffwechsel von Progesteron konnte bereits in mehreren Fällen eine direkte regulatorische Verknüpfung wahrscheinlich gemacht werden,so z.B. beim Menschen (129) und der Ratte (130,131).

Das jüngste Beispiel dieser Art ist die 15α-Hydroxylierung von Testosteron in Mikrosomen von 129/J-Mäusen,die in weiblichen Tieren ca. 5-mal höher ist als in männlichen. Die korrespondierende elektrophoretische P-450 - Isoform ist vor kurzem rein dargestellt und charakterisiert worden (132). Eine Steroid-16α - Hydroxylase scheint dagegen in männlichen Mäusen höher zu sein (133).

Die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen treffen - wenn auch möglicherweise zu unterschiedlichem Ausmaß - auf beide Geschlechter zu. Falls also geschlechtsspezifische Faktoren die Expression der hepatischen Progesteron-21-Hydroxylase im NZW-Kaninchen steuern sollten,so müßten diese sich nach Art und Wirkungsweise von denjenigen in Ratte oder Maus erheblich unterscheiden.

Beim Menschen gelangt Progesteron während der Schwangerschaft in allmählich ansteigenden Mengen in den Blutkreislauf. Die erhöhten Konzentrationen von Progesteron im Plasma werden von einer Zunahme der Konzentration von DOC begleitet (134). Dieses DOC scheint nicht aus der Nebenniere zu stammen ,sondern durch 21-Hydroxylierung des zirkulierenden Progesterons (112, 134), möglicherweise durch "Cytochrom P-450"-Katalyse in der Niere (135), direkt am Ort seiner Wirkung,der Niere also,zu entstehen.

Winkel et al. konnten nachweisen, daß sowohl in vivo zwischen verschiedenen Individuen, als auch in vitro zwischen dem mikrosomalen "Cytochrom P-450" aus Nieren verstorbener Personen erhebliche Unterschiede in der Fähigkeit bestehen, extra-adrenal Progesteron in DOC zu überführen. Der Versuch allerdings, zwischen schwangerschaftsverknüpftem Bluthochdruck und hoher extra-adrenaler in vivo - Progesteron-21-Hydroxylierungsrate eine positive Korrelation nachzuweisen, schlug fehl (136).

Als Gründe hierfür kommen in Betracht die relativ geringe mineralocorticoide Wirksamkeit von DOC (1/50 von Aldosteron), Gegensteuerung durch andere kreislaufwirksame Hormone oder kurzfristige regulative Einflüsse auf das "Cytochrom P-450" selbst durch endogene Aktivatoren/Inhibitoren auf der Transskriptions-, Translations- oder Expressionsebene. Diese letzteren Möglichkeiten sind auch bereits als Ursache dafür genannt worden, daß es in dieser Arbeit nicht gelang, zwischen Q(P⟶DOC) und dem Status 21h oder 21n der untersuchten Tiere eine Übereinstimmung herzustellen (s. S. 56). Die neueste Arbeit zu diesem Thema widerspricht allerdings solchen kurzfristigen Einflüssen und ihrer Auswirkung auf der in vivo - Ebene: Der durch Aktivitätsbestimmung in Biopsie-Proben festgestellte Phänotyp 21h von 18/53 Tieren war über mindestens 2 Monate konstant (186).

Zusätzlich komplizierend für die Bestimmung des Q(P⟶DOC) mag jedoch der Sekundärstoffwechsel von DOC wirken: Sowohl für den Menschen (137), als auch für das Kaninchen (138) ist von einer raschen Weiteroxidation des DOC im Stoffwechsel zu verschiedenen 21- und 17-Karbonsäuren auszugehen. Nur im Kaninchen werden die entsprechenden Reaktionen durch das mikrosomale "Cytochrom P-450" katalysiert, möglicherweise also in direkter funktioneller Abfolge mit der Bildung von DOC aus Progesteron durch Isoform 1.

Vor kurzem wurde in der Milz von Meerschweinchen eine hochaffine Progesteron-21-Hydroxylase nachgewiesen (139). Ein zweiter funktioneller Aspekt der extra-adrenalen Bildung von DOC aus Progesteron verdient deshalb ebenfalls Beachtung: Da Progesteron immunsuppressive Eigenschaften hat (140), und DOC hierzu gegensinnig wirken könnte (141, 142) ist die Vermutung berechtigt, daß die Bildung von DOC aus Progesteron und ihre Regulation durch endogene Faktoren eine ernstzunehmende Determinante der Immunreaktivität sein könnte.

Festzuhalten bleibt, daß es in dieser Arbeit gelungen ist, zum erstenmal ein hepatisches Enzym des Steroidmetabolismus als anabolisches Enzym in einem Säuger zu identifizieren und ex vivo enzymkinetisch zu charakterisieren. Seine enzym-

kinetischen Parameter besitzen dieselben Zahlenwerte wie diejenigen funktionell gut bekannter Steroid-synthetisierender P-450 - Isoformen in der Nebenniere anderer Arten. Schon aus diesem Grund kann angenommen werden, daß Isoform 1 beim Kaninchen die Aufgabe hat, Progesteron durch 21-Hydroxylierung in DOC zu überführen.

Informationen über die Substrat- und Produkt-gerichtete Regulation dieser Reaktion konnten in vivo nicht gewonnen werden; die ex vivo - Daten zeigen zwar, daß sich unter NZW-Kaninchen zwei Gruppen seggregieren lassen, die sich bezüglich dieser Regulation um ca. den Faktor 10 unterscheiden. Es blieb jedoch die Frage unbeantwortet, warum DOC im Plasma von 21h-Tieren nicht in reproduzierbar höheren Konzentrationen angetroffen wird als im Plasma von 21n-Tieren. Der Grund mag sein, daß - dem derzeitigen Stand des Wissens entsprechend - DOC im Kaninchen als rasch weiteroxidiertes Zwischenprodukt der Umwandlung von Progesteron in mindestens zwei Steroidkarbonsäuren zu betrachten ist.

Damit stimmt überein,daß - zumindest in männlichen Tieren - auch Progesteron in Organen,die üblicherweise als nicht steroidogen gelten,jeweils nur kurzfristig auftauchen dürfte. Ober die funktionelle Bedeutung beider Hormone in solchen Organen im weiblichen,aber auch im männlichen Kaninchen,ist damit jedoch noch nichts ausgesagt. Sie könnte durchaus vom 21n/21h-Status des betreffenden Tieres/Organs determiniert sein. Dies kann ebenso auf Fremdstoffe,z.B. Benzphetamin, zutreffen,die von Form 1 bevorzugt umgesetzt werden. Ihr metabolisches Schicksal,und damit ihr pharmakotoxisches Potential,könnte sich unter 21n-Bedingungen erheblich von demjenigen unter 21h-Bedingungen unterscheiden.

Zur Abschätzung des pharmakotoxischen Potential eines Fremdstoffes ist es hilfreich, sein metabolisches Profil unter mindestens zwei möglichst ähnlichen, aber nicht identischen in vivo - Situationen zu kennen. Die mit dieser Arbeit zu Isoform 1 vorgelegten in vitro- und ex vivo-Daten bieten hierfür einen guten experimentellen Ausgangspunkt. Im Sinne der auf Seite 8 (zweiter Absatz) angesprochenen Zielsetzung könnte sich dieses Modell zur Eingrenzung und quantitativen Abschätzung regulatorisch oder genetisch festgelegter Risiken gegenüber dem pharmakotoxischen Potential körperfremder Stoffe auf der in vivo - Ebene eignen.

B. Polyfunktionalität und Polymorphismus der elektrophoretischen Form 3b

B.1. Die elektrophoretische Form 3b ist funktionell u n d strukturell polymorph.

Am Anfang dieser Arbeit hatte die Absicht gestanden, Schwankungen in der phänotypischen Expression bestimmter mikrosomaler Progesteron-Hydroxylierungen durch Schwankungen des mikrosomalen Gehalts elektrophoretisch bekannter P-450 - Isoformen zu erklären. Dies deshalb, weil das methodische Kriterium der elektrophoretischen (und nicht etwa das der chromatographischen oder immunologischen) Einheitlichkeit dasjenige war, welches mit den damals verfügbaren funktionellen Kriterien der Einheitlichkeit isolierter P-450 - Isoformen am ehesten in Übereinstimmung zu bringen war.

"Verunreinigungen" einer Präparation durch andere (funktionell allerdings bekannte) Isoformen hatten sich bis dahin immer durch mindestens diese beiden unabhängigen Methoden (SDS-PAGE und Bestimmung der Substrat-Spezifität) qualitativ und semiquantitativ bestimmen lassen. Das Kriterium der elektrophoretischen Einheitlichkeit konnte sich deshalb bis 1982 als anscheinend objektives Kriterium der funktionellen und strukturellen Einheitlichkeit isolierter P-450 - Isoformen international weitgehend durchsetzten: Beobachtete funktionelle Multiplizitäten waren von Präparation zu Präparation zumindest innerhalb desselben Labors genauso exakt reproduzierbar, wie ihre elektrophoretische Darstellung oder Kartierung durch SDS-PAGE.

Die wichtigste erkenntnistheoretische Konsequenz dieser rein methodisch bedingten Situation war, daß man dazu übergegangen war, die vermutete strukturelle Multiplizität des mikrosomalen "Cytochrom P-450" mit seiner in Gestalt der isolierten Isoformen elektrophoretisch darstellbaren Multiplizität gleichzusetzen.

Die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit falsifizieren die Hypothese von der Identität der elektrophoretischen und strukturellen Multiplizität des mikrosomalen "Cytochrom P-450". Gleich zu Beginn der Untersuchung der Substrat-Spezifität stellte sich heraus, daß eine der elektrophoretischen Isoformen von NZW-Kaninchen bezüglich des Substrates Progesteron in zwei funktionellen Varianten vorkommt, deren eine Progesteron in 6ß-Stellung zu hydroxylieren vermag, deren andere jedoch nicht (oder kaum; vgl. Tabelle 5).

Erst in jüngster Zeit gelang es, aus Mäuseleber eine P-450 - Isoform mit vergleichbar hoher Positions- (15α-)Spezifität bezüglich der Hydroxylierung von

Testosteron zu isolieren (132). Auch diese Isoform besitzt keine ausgeprägten Spezifitäten für die Umsetzung exogener Substrate.

Beide Form 3b-Varianten sind durch SDS-PAGE weder nach Wanderungsgeschwindigkeit und Molekulargewicht, noch nach dem Gehalt möglicher Verunreinigungen, noch an ihrem Häm/Protein - Verhältnis voneinander zu unterscheiden. Die enzymatische Analyse ergab zudem, daß 6ß$^+$-Form 3b zwei katalytisch aktive Zentren (Zentrum 1 und Zentrum 2) besitzen muß.

Zentrum 1 ist charakterisiert durch seine Fähigkeit, Progesteron sowohl in 6ß- wie in 16α-Stellung mit niedriger Km (hoher Affinität) zu hydroxylieren. In Zentrum 2 dagegen wird Progesteron nur in 16α-Stellung und nur mit hoher Km (niedriger Affinität) hydroxyliert. Zentrum 2 besitzt jedoch eine höhere Umsatzkapazität (höhere Vmax für die 16α-Hydroxylierung) als Zentrum 1. In 6ß$^-$-Form 3b konnte nur Zentrum 2 nachgewiesen werden (zur Erläuterung der möglichen regulatorischen Bedeutung dieser Parallelität von Affinität und Kapazität:s.S.121).

6ß$^+$-Form 3b wird durch das Substrat-Analoge 16α-Methylprogesteron und verschiedene reduzierte Steroide kompetitiv gehemmt, die 6ß$^-$-Form dagegen durch dieselben Verbindungen in unterschiedlichem Ausmaß aktiviert.

Trotz all dieser Unterschiede katalysieren beide Varianten die 4-Hydroxylierung von Biphenyl und die 7-Hydroxylierung von 2-Acetylaminofluoren sowie die Oxidation einer Reihe weiterer Xenobiotica mit vergleichbaren Geschwindigkeiten.

Die meisten Form 3b-Präparationen aus NZW-Kaninchen müssen sich aus mindestens zwei unabhängig voneinander variierenden, jedoch sich immer zum selben Molekulargewicht addierenden Strukturanteilen zusammensetzen. Dies wird in IV.B.3.,S.112 ff. näher erläutert werden. Das funktionelle Korrelat dieser Strukturanteile in der 6ß$^+$-Form 3b sind die Zentren 1 und 2. Eine einzige von 24 NZW-Präparationen jedoch, sowie alle Präparationen aus dem Inzuchtstamm IIIVO/J enthalten nur einen dieser Strukturanteile in möglicherweise mehrfacher, mindestens zweifacher Anzahl (IV.B.3.).

Der hier beschriebene funktionelle Polymorphismus elektrophoretisch identischer, und dennoch funktionell unterscheidbarer Isoformen ist ein neuer, verfeinerter biochemischer Ausdruck für funktionelle Multiplizität und strukturellen Polymorphismus des mikrosomalen "Cytochrom P-450" und seiner elektrophoretischen Isoformen.

B.2. Allosterische Aktivierung beider Form 3b - Varianten durch reduzierte Steroide.

Neben dem Nachweis des strukturellen Polymorphismus einer elektrophoretisch wohldefinierten P-450 - Isoform ist es in dieser Arbeit auch erstmals gelungen, in einer solchen Isoform neben den (dem) katalytischen Zentren 1 und 2 die Anwesenheit eines allosterischen Zentrums 3 nachzuweisen. Durch Bindung bestimmter Steroide (einschließlich Progesteron) an dieses Zentrum wird die 16α-Hydroxylierung von Progesteron in Zentrum 2 vielleicht erst ermöglicht, mindestens jedoch bis zum Vierfachen des Kontrollwertes beschleunigt.

Kurzfristige, an die unmittelbare Anwesenheit eines Effektors gebundene Aktivitätserhöhungen sind zu unterscheiden von Aktivitätserhöhungen infolge von Induktion des "Cytochrom P - 450". Erstere können in vitro erzeugt werden (28, 56, 62, 63, 143), letztere dagegen nicht. Der Mechanismus, nach dem solche kurzfristigen Aktivierungen auf der mikrosomalen Ebene stattfinden, ist unklar. Die Schwierigkeit liegt darin, daß es mit enzymkinetischen Methoden kaum möglich ist, aktivierende, inhibierende oder Null-Effekte eines bestimmten Effektors bezüglich verschiedener, gleichzeitig anwesender P-450 - Isoformen in Mikrosomen auseinanderzuhalten, geschweige denn, solche Effekte den bekannten P-450 - Isoformen zuzuordnen. Als Beispiel hierfür sei auf Messungen mit Flavonen an Mikrosomen verwiesen (144).

Die hier vorgelegten enzymkinetischen Daten von Form 3b (beide Varianten) belegen erstmals experimentell, daß es erlaubt ist, sich bezüglich des Mechanismus solcher Aktivierungen prinzipiell dieselben Vorstellungen machen wie zur Aktivierung bereits besser bekannter Enzymproteine oder Multienzymkomplexe.

Die Anwesenheit des allosterischen Zentrums 3 folgt dabei vor allem aus der Sättigbarkeit des Effektes bei relativ niedrigen Effektorkonzentrationen, der steilen Dosis/Wirkungs- Beziehung und - damit verbunden - der geringen, zur Erreichung eines halbmaximalen Effekts nötigen Effektor-Konzentration. Diese Konzentration ist viel geringer als für andere positive Effektoren "Cytochrom P-450" - abhängiger Reaktionen (62, 143) und spricht für die Spezifität dieser Wechselwirkung.

Neben der Spezifität unterstreichen die Sättigbarkeit selbst und die strukturelle Abhängigkeit ebenfalls die Anwesenheit einer unabhängigen dritten (zweiten) Bindungsstelle in der $6\beta^+$- ($6\beta^-$-) Form 3b.

Als definitiver Beweis für die Anwesenheit dieses Zentrums ist der in Abbildung 29

dargestellte Sachverhalt zu sehen. Permanente Aktivierung und gleichzeitiger kovalenter Einbau des Effektor-Analogen in 6ß⁻-Form 3b sind tatsächlich nur dann zu verstehen, wenn eine unabhängig von Zentrum 2 stattfindende Wechselwirkung zwischen dem Effektor und dem Enzymprotein vermittels Zentrum 3 angenommen wird.

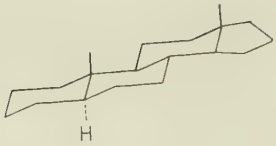
Zum Mechanismus der Aktivierung wurde bereits gesagt (S. 83), daß er sich kinetisch in einer Vergrößerung der Reaktionskonstante erster Ordnung auswirkt. Er unterscheidet sich damit von dem als unzpezifisch zu betrachtenden stimulierenden Effekt von Aceton auf die Hydroxylierung von Acetanilid (62), wo sich das Vmax/Km - Verhältnis nicht ändert, weil beide Parameter gleichmäßig zunehmen.

Auf den Reduktase-vermittelten Mechanismus, nach dem Flavone auf die in vitro-Hydroxylierung von Benz(a)pyren aktivierend wirken, wurde bereits ausführlich Bezug genommen (S. 88).

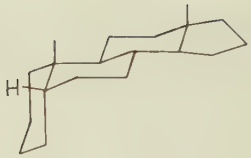
Hinsichtlich der Spezifität der Bindung der Effektoren sind mindestens zwei Gesichtspunkte zu unterscheiden: Zum einen die spezifische Wechselwirkung zwischen Zentrum 3 und den Effektoren, zum andern die Fähigkeit der Effektoren, Zentrum 1 (Hemmung) und Zentrum 3 (Aktivierung) in voneinander unabhängiger Weise zu identifizieren. Zu einer eventuell möglichen direkten Wechselwirkung zwischen Zentrum 2 und den Effektoren ist aufgrund der vorliegenden Daten keine positive Aussage möglich außer der, daß sie selbst bei hohen Konzentrationen die 6ß⁻-Form nicht hemmen und deshalb an dieses Zentrum nicht zu binden scheinen.

Die Wechselwirkung mit Zentrum 3 ist u.a. an die Anwesenheit eines 5ß-reduzierten Ringes A geknüpft, 5α-reduzierte Verbindungen sind praktisch unwirksam. 3ß-Reduktion wirkt nur in Verbindung mit der 5ß-Positionierung von Ring A aktivierend; umgekehrt ist die Beziehung weniger streng, d.h.: auch 3-Keto-Verbindungen haben eine beträchtliche stimulierende Wirkung, sofern sie 5ß-reduziert sind.

Die folgende Abbildung 33 zeigt, wie sich 5ß-/3ß- von 5α-/3ß-reduzierten Verbindungen unterscheiden: Die 5ß-Reduktion der Doppelbindung in Position 4 von Progesteron führt zur Ausbildung eines ungefähr rechten Winkels zwischen den Ringen A und B, wogegen die 5α-Reduktion ihre vorherige, annähernd ebene Verknüpfung kaum verändert (35). Die verlangte ß-Orientierung der Hydroxylgruppe in 3-Stellung läßt auf eine sterisch festgelegte Wasserstoffbrückenwechselwirkung mit dem Apoprotein an dieser Stelle schließen. Es ist nicht



5α-Reduktion



5β-Reduktion

ABBILDUNG 33: Strukturvergleich Ring A - reduzierter Steroide (Text S. 109).

erstaunlich, daß Zentrum 3 zwischen diesen beiden, drastisch verschiedenen Strukturen so deutlich differenziert.

Schwieriger ist die Unterscheidungsfähigkeit der Effektoren zwischen Zentrum 1 und Zentrum 3 zu verstehen, die ja nur dadurch meßbar geworden war, daß verschiedene Verbindungen sowohl verschieden stark inhibierten wie aktivierten.

Verschieden starke Aktivierungsgrade könnten für 6β⁻-Form 3b dadurch erklärt werden, daß die Verbindungen das niederaffine Zentrum 2 verschieden stark hemmen, ohne sich bezüglich ihrer Wechselwirkung mit Zentrum 3 zu unterscheiden. Diese Möglichkeit zur Erklärung der verschiedenen Aktivierungsgrade scheidet jedoch deshalb aus,weil selbst bei hohen Effektor-Konzentrationen keine Hemmung von Zentrum 2 durch einen der Effektoren beobachtet werden konnte (s.o.). Die Aktivierungsgrade sind also,soweit von 6β⁻-Form 3b die Rede ist,tatsächlich der enzymkinetische Ausdruck verschieden starker direkter Wechselwirkungen zwischen den Effektoren und dem allosterischen Zentrum 3.

Komplizierter ist die Lage bei Betrachtung der 6β⁺-Form 3b. Die gemessenen Effekte auf die 16α-Hydroxylierung sind hier Mischeffekte, die aus gleichzeitiger kompetitiver Hemmung (Zentrum 1) und Aktivierung (Zentrum 2, vermittelt durch Zentrum 3), resultieren. Hemmung und Aktivierung variieren jedoch für verschiedene Verbindungen unabhängig voneinander, wie der Vergleich der Wirkungen von 20α-Hydroxy-5β-Pregnan-3-on und des entsprechenden 3β-reduzierten "Diols" zeigte: Erstere Verbindung ist ein sehr guter kompetitiver Inhibitor von Zentrum 1 und ähnelt damit stark dem Effektor 16α-Methylprogesteron. Bezüglich der Aktivierung von 6β⁻-Form 3b nimmt sie dagegen eine Mittelstellung zwischen 16a-Methylprogesteron und dem besten Aktivator,dem 3β-reduzierten "Diol" , ein, das seinerseits auf Zentrum 1 keinerlei inhibierende Wirkung hat. Hauptsächlich wegen dieser ausschließlich aktivierenden Wirkung des "Diols" ist trotz der Komplexität der Effektor-beeinflußten Kinetik von 6β⁺-Form 3b die Feststellung gerechtfertigt, daß zur Erkennung von Zentrum 1 und Zentrum 3 an 6β⁺-Form 3b verschiedene Strukturelemente an dem reduzierten Steroid-Grundgerüst benötigt werden. Trotz ihrer räumlichen Nähe (größte Länge des 4-Ring-Systems: ca. 10 Å) werden sie von den beiden Bindungszentren offenbar getrennt erkannt.

Erwähnt sei noch, daß die unterschiedliche Fähigkeit dieser Verbindungen, aktivierend zu wirken, auch dadurch erklärt werden könnte, daß man annimmt, sie seien unterschiedlich gute alternative Substrate von Zentrum 1 oder 2. Sie hätten dann in der Inkubationsmischung unter Umständen gar keine Zeit, als Inhibitoren wirksam zu werden. Da manche dieser Verbindungen jedoch überhaupt nicht hemmen, sie

sich anderseits aber strukturell sehr ähnlich sind, ist dies zumindest angesichts der kurzen gewählten Inkubationszeiten (Substratumsatz weniger als 10%) unwahrscheinlich, es sei denn, man unterstellte extrem hohe Umsatzzahlen.

Zusammenfassend gesehen, unterstreichen die unterschiedlichen Aktivierungsgrade und ihre von der Hemmung unabhängige Variation die Anwesenheit zweier katalytischer Zentren in 6β$^+$-Form 3b. Entsprechend der Anmerkung auf S.88 konnten damit die Schlußfolgerungen aus D.2.4 durch eine zusätzliche Methode abgesichert, sowie die Anwesenheit des allosterischen Zentrums 3 wahrscheinlich gemacht werden.

Der definitive Beweis für die Existenz von Zentrum 3 in 6β$^-$-Form 3b (und durch Analogieschluß auch in 6β$^+$-Form 3b) ist in den Ergebnissen aus den Versuchen zur kovalenten Markierung des Enzyms (D.3.1.ff.) zu sehen.

B.3. Einfachster Strukturvorschlag für die elektrophoretische Isoform 3b; Vergleich mit Strukturhinweisen für andere P-450-Isoformen aus Kaninchenleber.

In dieser Arbeit konnte auf das biochemische Korrelat des funktionellen und strukturellen Polymorphismus der elektrophoretischen Form 3b nur ein kurzer Blick geworfen werden. Der entscheidende strukturelle Hinweis wurde durch die Auftrennung der tryptischen Peptide beider Varianten durch HPLC erhalten: Die eine Variante enthielt ein bestimmtes Peptid, die andere nicht bzw. an anderer, vorerst nicht aufgefundener Stelle (vgl. Abb. 31 und 32).

Diese letztere Beobachtung ließe sich zwar schon durch Mutation nur einer einzigen Aminosäure in dem "fehlenden" Peptid 14 erklären. Die einfachste Möglichkeit jedoch, die zusätzlich zu fordernde unabhängige Variation mindestens zweier Strukturanteile in 6β$^+$-Form 3b in einer Modellvorstellung zu formulieren besteht darin, sich diese Variante aus mindestens zwei Polypeptidketten vom halben Molekulargewicht der isolierten elektrophoretischen Isoform 3b zusammengesetzt zu denken, die sich einer elektrophoretischen Trennung (bisher) "erfolgreich" widersetzt haben. Unter Einbeziehung einer Mutation im Bereich von Peptid 14, dessen Lage in der Nähe des hochaffinen Zentrums 1 immerhin denkbar ist, lassen sich beide Form 3b - Varianten als Assoziat mindestens zweier kovalent verknüpfter Polypeptidketten beschreiben (Abbildung 34, und Erklärungen hierzu, s.S.114)

Die Kurzschreibweise für dieses Modell ("6β$^+$/6β$^-$" = 6β$^+$-Form 3b; "6β$^-$/6β$^-$" = 6β$^-$-Form 3b;vgl. Abb.34) deutet jedoch bereits an,daß es einer experimentellen Bestätigung

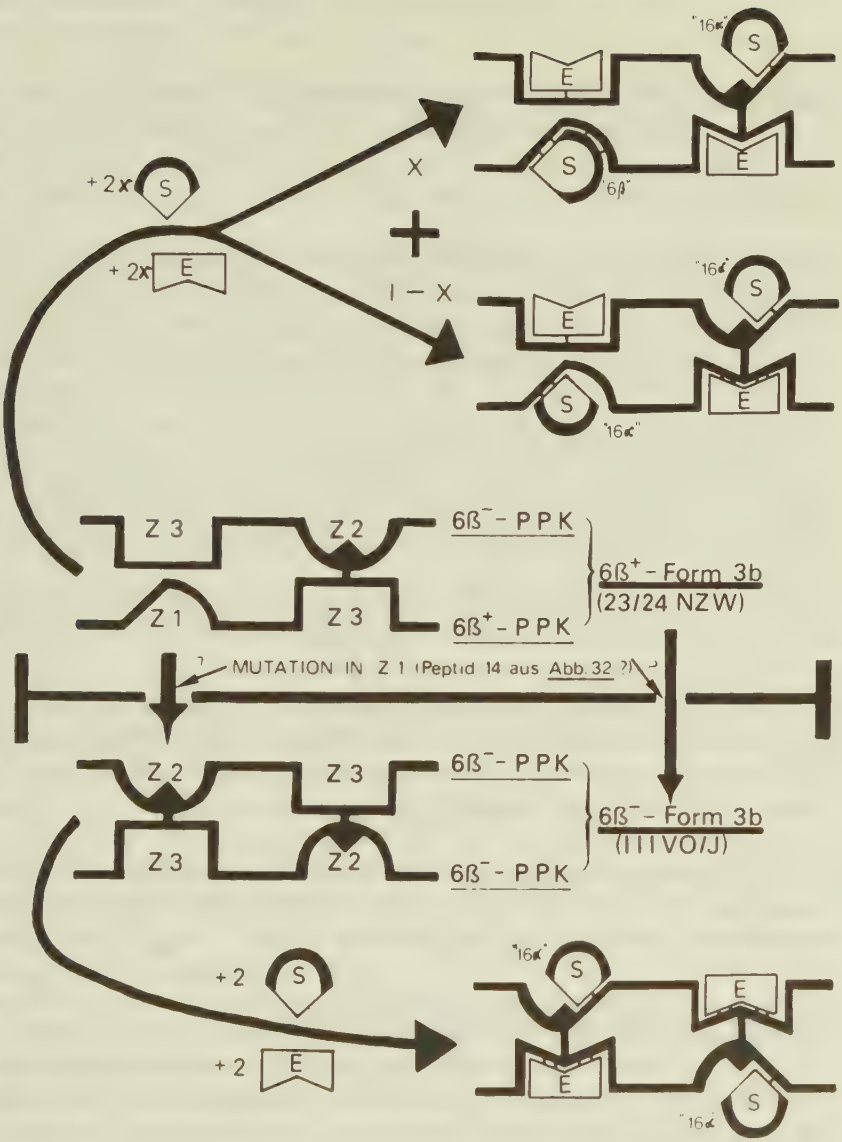


Abb. 34: Erläuterung nächste Seite.

ABBILDUNG 34: Modellvorschlag für die Tertiärstrukturen von 6β⁺- und 6β⁻-Form 3b (vgl. S. 113).

Erläuterungen für das Substrat Progesteron ("S")[1]:

A: An 6β⁺-Form 3b bindet Progesteron als Substrat auf dreierlei Weise:

1.) Hochaffin in Z 1 (--> "Hochaffine 6β-Hydroxylierung"; vgl. III.D.2.3.1.);
2.) Mittelaffin in Z 1 (--> "Hochaffine 16α-Hydroxylierung"; vgl. III.D.2.3.2.);
3.) Niederaffin in Z 2 (--> "Niederaffine 16α-Hydroxylierung"; vgl. " ").

Die Bindung des Effektors E ist ohne Einfluß darauf, ob es in Z 1 zu einer 16α- oder 6β-Hydroxylierung von S kommt. Andererseits ist die Bindung von E in Z 3 die Voraussetzung dafür, daß es in Z 2 zur Bindung des Substrates und damit zur niederaffinen 16α-Hydroxylierung kommt (beachte jedoch C.).

Die Anzahl der zwischen S oder E und dem Apoprotein eingetragenen Verbindungen soll die jeweilige Bindungsstärke im Enzym/Substrat-Übergangskomplex andeuten.

B: An 6β⁻-Form 3b bindet Progesteron als Substrat nur in Z 2, also niederaffin (s.o.). Dies erklärt, warum dort nur die niederaffine 16α-Hydroxylierung zu beobachten ist. Voraussetzung hierfür ist jedoch ebenfalls die gleichzeitige Bindung von E in Z 3 (beachte jedoch C.).

C: Als Effektor kann im Falle von Progesteron auch das Substrat selbst betrachtet werden, da es mit steigender Konzentration seine niederaffine 16α-Hydroxylierung aktiviert (vgl. Abb.18 und Text S.68).

D: Die Überführung von 6β⁺-Form 3b in 6β⁻-Form 3b könnte dadurch stattfinden (stattgefunden haben), daß Z 1 durch eine Mutation in Z 2 überführt wird (wurde). Eine solche Mutation müßte auch gleichzeitig die angedeutete räumliche Beziehung zu Z 3 herstellen. Diese könnte identisch sein mit der vermuteten kovalenten Beziehung zwischen den beiden PPK.

E: Wichtig ist, daß eine Bindung des Substrates Progesteron in Z 2 nicht stattfinden kann ohne Beteiligung von Z 3. Exogene Substrate dagegen werden in Z 1 und Z 2 gleich effektiv umgesetzt (vgl. Tab.6, Seite 65).

---

[1] Abkürzungen: PPK = Polypeptidkette (ca. 26000 d); Z = Zentrum; E = Effektor (reduziertes Steroid oder Progesteron selbst); S = Substrat Progesteron.

durch eine mit "$6\beta^{+}/6\beta^{+}$" beschreibbare elektrophoretische Form 3b bedarf. Diese Variante sollte zweimal das hochaffine Zentrum 1 und zweimal das allosterische Zentrum 3, nicht jedoch Zentrum 2 enthalten.

Von den in der Literatur vorgeschlagenen Erklärungsmodellen für die funktionelle Multiplizität des mikrosomalen "Cytochrom P-450" kommt dieser Vorstellung das der Immunologie entlehnte Nebert'sche Bild (22,23,64; s. auch EINLEITUNG, S.3/4) am nächsten.

In einer heterologen Mischung von gegen dasselbe Gen gerichteten Antikörpern scheint jede einzelne Antikörperstruktur ein distinktes Gen-Produkt zu sein. Seit längerer Zeit bereits werden auch die elektrophoretischen, durch Peptidkartierung unterscheidbaren P-450 - Isoformen aus Kaninchenleber als distinkte Genprodukte betrachtet (71,79,81,107,108). Das Neue des aus dieser Arbeit sich ergebenden Tertiärstrukturvorschlags für Form 3b besteht darin, daß diese elektrophoretische Isoform ihrerseits als Assoziat primärstrukturell eng verwandter Polypeptidketten, bzw. Genprodukte aufzufassen ist. Die Evidenzen dieser Arbeit erlauben erstmals die experimentell begründete Einbeziehung analoger Strukturvorschläge in die Diskussion der Tertiärstruktur anderer elektrophoretischer P-450 - Isoformen, so z.B. der vermutlich ebenfalls zwei katalytische Zentren besitzenden Progesteron-17α-Hydroxylase/17.20-Lyase des Rattenhodens (144a,b).

Für Isoform 4 aus Kaninchenleber war bereits 1977 - allerdings ohne experimentellen Hinweis auf ein funktionelles Korrelat - ein vergleichbarer Vorschlag gemacht worden, und zwar auf Grund von Ergebnissen der NH_2-Endgruppenanalyse (145). Hierzu wurden inzwischen weitere Daten veröffentlicht (146). Im vorliegenden Fall allerdings hatte umgekehrt die Auffindung des funktionellen Korrelats an erster Stelle gestanden - erst dadurch war die gezielte Suche nach dessen struktureller Entsprechung überhaupt möglich geworden. Dies überrascht nicht, wenn man berücksichtigt, daß es bezüglich Form 3b (beide Varianten), im Gegensatz zu Isoform 4, aus der NH_2-Endgruppenanalyse noch keinerlei Hinweis darauf gegeben hatte, sie könnte aus 2 (oder mehr) Polypeptidketten bestehen.

Auf gewisse primärstrukturelle Variationen zwischen verschiedenen Form 3b-Präparationen läßt, neben den in dieser Arbeit vorgestellten Befunden, auch zur Zeit noch, lediglich die Beobachtung schließen, daß in Aminosäure-Position 10 vom NH_2-Ende her statt Tyrosin (E.F. Johnson, $6\beta^{+}$-Form 3b) wahlweise auch Leucin (E.F. Johnson, $6\beta^{-}$-Form 3b) oder Threonin (nicht näher spezifizierte Form 3b-Variante, M. Coon) gefunden werden (Abbildung 35). Die Summenformel von Peptid 14 allerdings läßt sich mit keinem der in Abbildung 35 dargestellten NH_2-Termini in Übereinstimmung bringen. Daraus muß geschlossen werden, daß es sich hierbei (Peptid 14 und die Aminosäure in Position 10 vom NH_2-Ende her) um zwei unabhängig voneinander variierende primärstrukturelle Parameter der elektrophoretischen Form 3b handelt.

NH_2-TERMINI[a] VERSCHIEDENER FORM 3b - VARIANTEN:

QUELLE	AUTOREN	SEQUENZ	IDENTITÄT
NZW	E.F. JOHNSON et al.	Met-Asp-Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Gly-Ile-Tyr-Leu	6ß⁺-Form 3b
	Pos. Nr.	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11	
NZW	M.J. COON et al.	Met-Asp-Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Gly-Ile-Thr-Leu	?
	Pos. Nr.	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11	
IIIVO/J	E.F. JOHNSON et al.	Met-Asp-Leu-Leu-Ile-Ile-Leu-Gly-Ile-Leu-Leu	6ß⁻-Form 3b
	SUMMENFORMEL[a] von PEPTID 14 aus Abb. 31/32.		
NZW	E.F. JOHNSON et al.	Arg·His·$(Asx)_2$·$(Glx)_2$ Ser·Ile·Pro	6ß⁺-Form 3b

[a] pers. Mitteilung v. E.F. JOHNSON, La Jolla, USA, an den Autor (1982)

ABBILDUNG 35: Primärstrukturelle Variationen zwischen Form 3b-Präparationen verschiedener Herkunft und Genotyps. Vergleich mit der Aminosäurezusammensetzung von Peptid 14 aus Abb. 31/32.

Interessant ist die Anmerkung, daß die Verwendung von "random bred"-Einzeltieren als Quelle für die Präparation von Form 3b (beide Varianten) die entscheidende Bedingung dafür war, daß in der Arbeitsgruppe von M. Coon in Ann Arbor bei der Aminosäuresequenzierung vom NH_2-Ende her nach anfänglichen Schwierigkeiten auch für Position 10 gleichbleibend hohe Ausbeuten erhalten wurden (75). Die von mir in dieser Arbeit und von E.F. Johnson (La Jolla) verwendeten Präparationen stammten von vornherein aus Einzeltieren; die Vermutung ist berechtigt, daß der strukturelle und funktionelle Polymorphismus von Form 3b aus NZW-Kaninchen nie hätten Gegenstand dieser Arbeit werden können, wenn Tabelle 5 auf Grund von Messungen an Mischpräparationen zustandegekommen wäre.

B.4. Vergleich mit Strukturhinweisen für P-450-Isoformen aus Rattenleber.

Infolge der vorläufigen Unmöglichkeit, Subformen" und "Alloformen" (147) des "Cytochrom P-450" mit Hilfe physikochemischer Methoden homogen als solche darzustellen, mußte in den letzten 2 Jahren auf die aufwendigen gentechnischen Verfahren zurückgegriffen werden (148-152). Durch DNA-Klonierung und Sequenzierung ist es zwischenzeitlich gelungen, eine über 95%ige strukturelle Homologie zwischen zwei (148) bzw. vier (149) durch PB in der Ratte induzierbaren P-450-Isoformen nachzuweisen. Alle vier Isoformen lassen sich zwar durch zweidimensionale PAGE elektrophoretisch voneinander trennen, sind jedoch, ebenso wie die beiden Form 3b-Varianten gegenüber dem monoclonalen Antikörper MCA-A (vgl. S. 29);[1] immunchemisch anscheinend identisch. Da $6\beta^+$/$6\beta^-$-Form 3b sich auch durch diese neue elektrophoretische Methode nicht voneinander trennen lassen (75), dürfte die zwischen ihnen bestehende Strukturhomologie sogar noch über 95% liegen.

Die mRNA der beiden von Kumar et al. (148) untersuchten Isoformen der Ratte hybridisiert sehr effektiv mit einer geklonten cDNA, die für die 211 COOH-terminalen Aminosäuren der wichtigsten durch PB induzierten Isoform kodiert. Die Homologie aller drei Isoformen in diesem Strukturbereich beschränkt sich jedoch auf ein von divergenten Regionen eingefaßtes Tridecapeptid, wie aus (150) und (151) hervorgeht. Fast dasselbe Tridecapeptid wurde von Ozols et al. auch in den Formen 3b (Variante ?) und Form 2 aus Kaninchenleber identifiziert (108).

Ansonsten aber sind sich die Primärstrukturen dieser beiden Kaninchenleber-Isoformen sehr unähnlich. Oberhaupt scheint das Ausmaß inter- und intraspezifischer Aminosäuresequenz-Homologien zwischen den elektrophoretischen Isoformen verschiedener Herkunft und Entstehungsgeschichte geringer zu sein, als bei anderen bekannten Isoenzymgruppen aus Wirbeltieren (153). Zudem kommen interspezifische Sequenzüberlappungen häufiger vor als intraspezifische (146,154).

---

[1] Der neue monoclonale Antikörper "8-27" vermag zwischen $6\beta^+$- und $6\beta^-$-Form offenbar zu unterscheiden (selektive Hemmung der hochaffinen 6β-Hydroxylierung: (187); spezifische Erkennung von Peptid 14 (Abb. 31/32): (185)).

Primärstrukturelle Homologien von mehr als 90% bestehen dabei möglicherweise nur dann, wenn man es - wie vor kurzem von Levin et al. (155) für das Beispiel zweier P-450 - Isoformen der Ratte weiter belegt - mit Isoformen zu tun hat, die demselben Induktor (endogenen Regulator ?) zuzuordnen sind, und die sich physikochemisch nur schwierig oder garnicht voneinander trennen lassen. Auch die Daten der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, daß die elektrophoretischen Isoformen offenbar nicht die einfachsten Untereinheiten des "Cytochrom P-450" sind.

Vor dem Hintergrund dieses Wissens ist die Feststellung in (153), das Ausmaß der primärstrukturellen Homologie zwischen elektrophoretischen Isoformen des "Cytochrom P-450" sei geringer als bei anderen Isoenzymfamilien, nicht erstaunlich. Auf den Vergleich der Primärstruktur von 6ß$^{+}$-Form 3b mit derjenigen von 6ß$^{-}$-Form 3b darf man deshalb gespannt sein.

B.5. Genetischer Polymorphismus der elektrophoretischen Form 3b

Die Daten dieser Arbeit, sowie die vergleichbaren in (149), enthalten die bisher einzigen immunchemischen und primärstrukturellen Belege dafür, daß die Homologie zwischen strukturellen Einzelbestandteilen des "Cytochrom P-450" genau dann besonders hoch ist (155:97%), wenn "Subformen" oder "Alloformen" elektrophoretisch bekannter Isoformen miteinander verglichen werden. Nach wie vor sind sie aber auch die beiden einzigen Beispiele dafür, daß sich die differentielle phänotypische Expression solcher hoch homologer Strukturelemente des "Cytochrom P-450" Stamm-abhängig darstellen und damit auf einen genetischen Polymorphismus zurückführen läßt.

Diesem Sachverhalt entspricht der von Levin et al. benutzte Terminus "P-450 - Alloform" (147). Er soll am Beispiel von Long Evans- und Holtzman-Ratten zeigen, daß in beiden Inzuchtstämmen zwar dieselbe PB-induzierbare P-450 - Isoform (P-450b) zum Ausdruck kommt, ihr jedoch z.B. in Long Evans-Ratten ein Peptid "t" fehlt (149). Dies soll nicht auf eine post-translationale Modifikation der fertigen Polypeptidkette(n), sondern auf eine Mutation am Strukturgen von Isoform P-450b zurückgehen. Es ist bisher aber noch nicht gelungen, den zu vermutenden primärstrukturellen Unterschieden zwischen den Ratten-Isoformen P-450 b (Long Evans), P-450b (Holtzman) und P-450e (Long Evans) ein funktionelles Korrelat auf der phänotypischen Ebene zuzuordnen. Gerade umgekehrt ist die Lage bezüglich der in der EINLEITUNG bereits ausführlicher erwähnten Untersuchungen von Nebert et al. zum Ah-locus bestimmter Maus-Inzuchtstämme (vgl. S. 10): Dort ist in Form des cytosolischen TCDD-Rezeptors zwar ein eindeutiges funktionelles Korrelat genetischer

Variationen bekannt. Es war aber noch nicht möglich, die TCDD-induzierten P-450 - Isoformen unterhalb der elektrophoretischen Ebene strukturell zu differenzieren oder funktionell zuzuordnen.
Die Nebertschen Studien haben jedoch als erste gezeigt, daß durch die Methode der gezielten, Merkmal-bezogenen Inzuchtbildung genetisch vermittelte Enzym-Defekte oder -Defizienzen des "Cytochrom P-450" auf der phänotypischen Ebene festgelegt und damit experimentell zugänglich gemacht werden können. Sie ist ein wertvolles Verfahren für die Eingrenzung der Rolle eines Proteins im Stoffwechsel, das Verständnis seiner Regulationsfaktoren, die Verknüpfung struktureller mit funktionellen Eigenschaften von Proteinen und die Herausarbeitung stabiler genetischer Polymorphismen.

Es wurde hochgerechnet, daß ca. 25% zufällig herausgegriffener Enzyme bezüglich ihres Strukturgens genetisch polymorph sind (156). Ein gut untersuchtes funktionelles Beispiel hierfür ist der Coh-locus von Mäusen (vgl. S. 10). Er codiert für verschiedene Ausprägungen einer (mehrerer) P-450 - Isoform(en), die Cumarin in Position 7 mehr oder weniger schnell hydroxylieren (40,44). Der zugrunde - liegende Polymorphismus scheint sowohl für die Ratte wie für die Maus inzwischen nachgewiesen (157). Man kann deshalb davon ausgehen, daß zumindest einige der bisher beschriebenen elektrophoretischen Isoformen genetisch polymorph sind.
Die Informationsgehalte der entsprechenden Strukturgene müßten sich aber auf der phänotypischen Ebene proteinstrukturell und -funktionell fixieren lassen, sozusagen unter Aufzeigung der von Wood et al. (44-46), Nebert et al. (40-42) und Vlasuk et al. (149) herausgearbeiteten funktionell-enzymatischen, regulatorisch-genetischen und strukturell-genetischen Aspekte dieses Isoenzymsystems an einem einzigen Beispiel.

Die mit dieser Arbeit vorgestellten Daten vereinigen bezüglich der beiden Form 3b - Varianten bereits den enzymatisch-funktionellen mit dem genetischen Aspekt.
Die Progesteron-Hydroxylierung in Gegenwart der elektrophoretischen Form 3b ist ein phänotypischer funktioneller Parameter, der die Art der genetisch festgelegten Expression dieser Isoform sehr genau widerspiegelt: Ihre Fähigkeit, Progesteron in 6ß-Stellung zu hydroxylieren, kommt in Stamm IIIVO/J nicht zum Ausdruck.

Das entsprechende Strukturgen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit homozygot, da der Inzuchtkoeffizient dieses Stammes mit 0.98 sehr hoch liegt (158). Im Gegensatz dazu muß dieselbe Isoform in den meisten outbred NZW-Kaninchen von einem heterozygoten Gen codiert werden; in höchstens einem von 24 Fällen waren die aus einem NZW-Kaninchen und aus den IIIVO/J-Tieren isolierten Formen 3b zudem funktionell identisch.

Zwischen den als Präparationsquelle benutzten Mikrosomen und der daraus erhaltenen Form 3b-Variante bestand immer eine genaue funktionelle Entsprechung in Gestalt des jeweiligen Km-Wertes für die 6ß-Hydroxylierung. Die Übertragung dieser Entsprechung auf die in vivo-Ebene würde nur durch die unwahrscheinliche Möglichkeit verboten, bei der Präparation der Mikrosomen entstehe ein Genotyp-abhängiges Artefakt, das im einen Fall zu dem hohen, im andern Fall zu dem niedrigen Km-Wert für die 6ß-Hydroxylierung führe. Auch die einfache Abwesenheit von Isoform 3b in $6\beta^-$-Mikrosomen konnte ausgeschlossen werden. All diese Beobachtungen lassen sich nur durch die Schlußfolgerung erklären, der funktionelle Polymorphismus der elektrophoretischen Isoform 3b werde von einem genetischen Polymorphismus unterlagert.

Was das strukturelle Korrelat dieses genetisch-funktionellen Polymorphismus angeht, so konnte diese Arbeit nur einen ersten, allerdings eindeutigen Hinweis geben. Seine Übertragung auf die Ebene der Primärstrukturen von $6\beta^+$- und $6\beta^-$-Form 3b ist in Arbeit (75).

B.6. Mögliche physiologische Bedeutung und Regulation beider Form 3b-Varianten.

Obwohl die wichtigsten katabolischen Stoffwechselwege von Progesteron in weiblichen Tieren reduktiver Art sind (31,35,159), scheint nach der Reduktion häufig noch eine Hydroxylierung, meist in 6ß-Stellung, stattzufinden. Doch auch ohne vorherige Reduktion sind mikrosomale 6ß-Hydroxylierungen von Androgenen, Östrogenen, Mineralo- und Glucocorticoiden im Säugetierreich weit verbreitet (35).

Für 6ß-Hydroxyandrostendion ließ sich vor kurzem eine biologische, unter dem Einfluß des Renin-Angiotensin-Systems stehende biologische Funktion nachweisen (160); es erscheint deshalb nicht mehr korrekt, die 6ß-Hydroxylierung von Steroiden nach wie vor als katabolisch (90) einzustufen. In vivo ist die 6ß-Hydroxylierung von Progesteron und anderer Steroide beim Kaninchen (s. EINLEITUNG) und beim Primaten bzw. dem Menschen nachgewiesen (31,160-162).

16α-hydroxylierte Metabolite andererseits sind beim Kaninchen in vivo nicht bekannt. Beim Menschen dagegen besitzt zumindest die 16α-Hydroxylierung von Östradiol, namentlich während der Schwagerschaft, eine zentrale metabolische Funktion bei der Bildung von Östradiol (16α-Hydroxyöstradiol). Es ist in konjugierter Form das Hauptausscheidungsprodukt von Östradiol, zeigt daneben aber auch kurzfristige uterotrope Wirkungen (163).

Aus biochemisch-toxikologischer Sicht ist die Beobachtung interessant, daß es sich bei 6ß$^+$-Form 3b um ein polyfunktionelles Enzym handelt. Je nach angebotener Substrat-Konzentration katalysiert es entweder mit niedriger Geschwindigkeit und hoher Kapazität (niedrige Vmax und niedrige Km) oder mit hoher Geschwindigkeit und niedriger Kapazität (hohe Vmax und hohe Km) fast gleichbleibend effektiv. Auch in Abwesenheit der Aktivatoren (vgl. IV.B.2) ist deshalb der regulativ wirksame Substrat-Konzentrationsbereich wesentlich breiter als bei Enzymen mit nur einer enzymkinetisch erfaßbaren Phase (122); im vorliegenden Fall erstreckt er sich auf Progesteron-Konzentrationen von schätzungsweise 0.2 bis 50 µM, variiert also innerhalb eines Faktors von 250. Je nach Konzentration ist entweder 6ß- oder 16α-Hydroxyprogesteron das Hauptprodukt. In Gegenwart der 6ß$^-$-Form 3b wird dagegen nur 16α-Hydroxyprogesteron erhalten. Ein vergleichbarer Synergismus wird z.B. auch für eine hochspezifische und eine wenig spezifische Acetylcholinesterase aus Froschmuskel gefunden (165).

Dieser funktionelle Unterschied zwischen beiden Form 3b-Varianten kommt auch auf der mikrosomalen Ebene zum Ausdruck, wie Abbildung 9 zeigte: Bei kleinen Progesteron-Konzentrationen (unter 2 µM) unterscheiden sich 6ß$^+$- und 6ß$^-$-Mikrosomen ganz erheblich hinsichtlich ihrer Fähigkeit, dieses Hormon in 6ß-Stellung zu hydroxylieren. Der auf dieser Ebene gemessene Km-Wert lag zudem nicht höher als Werte, die in typischen steroidogenen Geweben (116,117) gefunden werden. Metabolische und physiologisch-funktionelle Konsequenzen dieser "6ß$^-$-Defizienz" sind also zumindest für weibliche Tiere wahrscheinlich.

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht versucht, dies auf der in vivo-Ebene nachzuweisen, nachdem bereits ein entsprechender Versuch bezüglich der Progesteron-21-Hydroxylierung nicht zum angestrebten Ergebnis geführt hatte (vgl. Abschnitt III.B.) Die bekannten Wege, nach denen Hydroxylierung und Reduktion von Steroidhormonen im Säugetier endogen gesteuert werden, sind ebenso vielfältig wie diejenigen für exogene Substanzen. (s. EINLEITUNG, S.11/12). Als die wichtigsten seien hier invariable Geschlechts- und Altersunterschiede genannt (31,82,164). Das Variationsmuster der letzteren wird entweder frühgeburtlich geprägt oder ist das Ergebnis kurzfristiger hormoneller Einflüsse unter Beteiligung der Hypophyse und sämtlicher Steroidhormon-produzierender Organe.

Die 5α-Reduktion von Testosteron bzw. die 2-Hydroxylierung von Östradiol werden durch proteinreiche Diät im Menschen erniedrigt bzw. erhöht (166). 5α-Dihydrotestosteron seinerseits stimuliert mittelfristig in der Ratte eine 3α- und eine 3ß-Steroid-Reduktase, inhibiert dagegen eine 5α-Reduktase (130). Eine ganze Reihe

reduktiver Progesteron-Metabolite wurde bereits 1970 im Kaninchen identifiziert (85); die Hemmung des Fremdstoffwechsels der Ratte durch einige dieser Verbindungen (167) kontrastiert mit der in dieser Arbeit beschriebenen Aktivierung von Form 3b.

Allgemein gelten 5β-Reduktionen als katabolisch, 5α-Reduktionen als anabolisch, weil letztere meist eine höhere biologische Aktivität besitzen als die unmittelbaren Vorstufen (35). Dementsprechend entstehen im weiblichen Organismus während der Schwangerschaft aus Progesteron große Mengen 5β-reduzierter katabolischer Steroide. 5β-, nicht aber 5α-reduzierte Steroide kommen als mögliche Auslöser von Porphyrinurie beim Menschen in Betracht, weil sie in Vogel-Embryonen die δ-Aminolävulinsäure-Sysnthetase aktivieren (168). Es ist auffallend, daß die in dieser Arbeit in vitro aufgezeigte Aktivierung katabolischer Steroid-Hydroxylierungen durch diese Verbindungen demselben Stereospezifitätsmuster folgt (vgl. D.2.6.).

Der angedeuteten Komplexität von Regulation und Funktion entspricht die Vielzahl bisher in vitro identifizierter und von einzelnen P-450 - Isoformen katalysierter Steroid-Hydroxylierungen. Sie können hier nicht alle aufgezählt werden, sind jedoch bei der Ratte am besten untersucht (vgl. 31). In jüngster Zeit wurden die Positionen 2α, 6β, 7α, 15α, 16α und 17β, je nach untersuchter P-450 - Isoform, als einem hydroxylierenden Angriff mehr oder weniger zugänglich identifiziert (169-171).

Die vor kurzem aus der Leber männlicher Ratten isolierte Isoform 5 hydroxyliert Testosteron in 16α-Position ca. 80-mal schneller als die entsprechende Iso- oder Alloform aus weiblichen Tieren (172). Es gibt bisher weder einen Hinweis auf funktionellen Polymorphismus dieser Ratten-Isoform 5 bezüglich des Substrates Testosteron, noch Anhaltspunkte für strukturellen Polymorphismus zwischen den beiden Allo- oder Isoformen. Die Substrat- und Produktspezifität der Präparation aus männlichen Tieren scheint aber ebenso ausgeprägt wie diejenige der Testosteron-15α-hydroxylierenden Isoform aus 129/J-Mäusen (132), oder der Isoform 3b und 1 aus Kaninchen (diese Arbeit). Diese, erst in jüngster Zeit puplizierten Parallelbefunde, sind als weiterer Beleg dafür zu betrachten, daß die biochemische Basis der hier beschriebenen funktionellen Unterschiede im mikrosomalen Stoffwechsel von Progesteron beim Kaninchen tatsächlich im funktionell-genetischen Polymorphismus des "Cytochrom P-450" und seiner elektrophoretischen Isoformen zu sehen ist. Die Möglichkeit, diese Unterschiede seien Ausdruck experimenteller Artefakte (24), scheidet deshalb aus. Zwar wäre es auch denkbar, daß in vivo die Hydroxylierung von Progesteron erst in nachgeschalteten Schritten, also auf der zellulären

Ebene gesteuert wird, etwa durch differentielle Expression resp. Induktion jeweils invariabler Strukturgene. Hinsichtlich Form 3b und ihres nachgewiesenen genetischen Polymorphismus erscheinen solche eher kurzfristig wirksamen Einflüsse aber unwahrscheinlich angesichts der immer gleichen Form 3b-Mengen, die unabhängig vom funktionellen Status aus allen Tieren isoliert werden konnten. Man müßte dann nämlich als Aktivator von 6ß$^-$-Form 3b bzw. Inhibitor von 6ß$^+$-Form 3b einen niedermolekularen Liganden postulieren, der die zahlreichen Reinigungsschritte unbeschadet zu überstehen hätte.

Auf Form 1 und ihre mögliche Regulation durch genetischen Polymorphismus läßt sich dieses Argument nicht mit derselben Ausschließlichkeit anwenden, solange es nicht gelungen ist, zumindest eines der beiden hier maßgeblichen Merkmale (21h oder 21n) durch Inzuchtbildung genetisch festzulegen. In diesen Zusammenhang gehört auch die vorgeschlagene Erklärung für das Ergebnis von Abschn. III.B. . Die mögliche Anwesenheit niedermolekularer Liganden konnte aber für beide elektrophoretischen Formen ausgeschlossen werden (Tabelle 7).

Die Regulation (Nicht-Expression) des 6ß-hydroxylierenden Strukturanteils von Form 3b in IIIVO/J-Kaninchen geht auch in vivo also höchstwahrscheinlich auf einen genetisch festgelegten Enzymdefekt zurück, vergleichbar etwa dem Defekt, der der Kongenitalen Adrenalen Hyperplasie zugrunde liegt (33,34). Er muß auf der strukturellen Ebene seine Entsprechung darin haben, daß dort dieser Strukturanteil (Polypeptidkette in Abb. 34) im Vergleich zur 6ß$^+$-Form 3b entweder nur in mutierter oder permanent chemisch modifizierter Form phänotypisch zum Ausdruck kommt. Glykosid-Reste allerdings scheiden hierfür aus, wie Daten in (108) zu entnehmen ist, ebenso kovalent gebundenes anorganisches Phosphat (eigene Untersuchung, ohne Darst.), etwa aus einem genetisch determinierten Phosphorylierungsschritt (vgl. DISKUSSION, S. 102, letzter Absatz).

Andererseits muß die positive Expression von 6ß$^+$-Form 3b in den meisten "random bred" NZW-Kaninchen einem zusätzlichen Regulationsprinzip unterliegen. Die Menge des hochaffinen 6ß-hydroxylierenden Strukturanteils in aus diesen Tieren erhaltenen Form 3b-Präparationen variierte von Tier zu Tier. Das zusätzliche, diesen Strukturanteil positiv steuernde Regulationsmoment könnte in kurzfristigen Umwelt- oder hormonellen Einflüssen zu sehen sein. Auch ein weiterer genetischer Polymorphismus, dessen Aufdeckung den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte, käme hierfür in Frage. Eine getrennte genetische Regulation beider "Subformen" wird dadurch nahegelegt, daß aus dem jüngst untersuchten Inzuchtstamm III/J die "normale" 6ß$^+$-Form 3b erhalten wird (185). Der IIIVO/J-Stamm ist also nach wie vor auch der einzige, durch dessen Züchtung sich die Genloci beider "Subformen" voneinander trennen ließen.

B.7. Versuch einer Bewertung aus biochemisch-toxikologischer Sicht.

Am Anfang dieser Untersuchung hatte die Absicht gestanden, die Beantwortung der auf S. 8 der EINLEITUNG aufgeworfenen Frage nach Ausmaß und Regulation der Multiplizität des mikrosomalen "Cytochrom P-450" voranzutreiben. Aus einleitenden Untersuchungen waren fünf Einzelfragen abgeleitet worden (S. 20), die für die beiden untersuchten Beispiele größtenteils beantwortet werden konnten. Die Arbeit blieb bei den Einzelantworten jedoch nicht stehen: Die gefundenen Unterschiede im mikrosomalen Progesteron-Metabolismus ließen sich Unterschieden in der Expression bestimmter P-450 - Isoformen zuordnen.

Bezüglich Form 1 ergaben sich dabei interessante Querbeziehungen zur differentiellen Expression der Progesteron-21-Hydroxylierung beim Menschen. Die Untersuchung der phänotypischen Expression von Form 3b mit Hilfe funktioneller (enzymkinetischer) Parameter zeitigte das überraschende Ergebnis, daß diese bisher als strukturell homogen und invariabel betrachtete, aber nur mit Hilfe ihrer elektrophoretischen Einheitlichkeit als solche definierte P-450 - Isoform genetisch polymorph ist. Sie kommt infolgedessen auf der phänotypischen Ebene strukturell und funktionell polymorph zum Ausdruck.

Innerhalb der bekannten Biochemie des "Cytochrom P-450" ist dies nach wie vor das einzige Modell, durch das sich die völlige Entsprechung dieser drei Aspekte seines Polymorphismus an einem einzigen Beispiel aufzeigen läßt. Damit sind auch Denkmöglichkeiten (z.B. in 22 und 23; vgl. EINLEITUNG, S.3/4) zu Ausmaß und Regulation der Multiplizität des mikrosomalen "Cytochrom P-450" konkretisiert, die bisher eher spekulativ waren.

Die Biochemische Toxikologie muß daran vor allem der Aspekt interessieren, daß es jetzt nicht mehr genügt, die schon des längeren bekannten intraspezifischen/interindividuellen Schwankungen des "Cytochrom P-450" - abhängigen Fremdstoffwechsels bei Säugern mit der Existenz einer mehr oder weniger begrenzten Anzahl elektrophoretisch voneinander trennbarer P-450 - Isoformen zu verknüpfen. Sie muß vielmehr davon ausgehen, daß diese elektrophoretischen Isoformen weder strukturell noch funktionell monomorph sind, die strukturelle und funktionelle Multiplizität des mikrosomalen "Cytochrom P-450" also wesentlich größer ist, als aufgrund bisheriger experimenteller Befunde angenommen werden konnte. Mit der Multiplizität wächst aber auch die Unübersichtlichkeit dieses Multi-Enzymsystems und die Anfälligkeit seiner Einzelkomponenten gegenüber unphysiologischen Regelgrößen, als welche vor allem Arzneimittel sowie Nahrungs- und Umweltkontaminantien zu betrachten sind. Die Multiplizität ihrerseits aber ist eine Funktion der diesbezüglichen genetischen Disposition.

Auch beim Menschen spielen Disposition und damit verbundene strukturelle und funktionelle Multiplizität des mikrosomalen 'Cytochrom P-450" eine bedeutende Rolle für Metabolismus und toxisches Potential von Fremstoffen. Dies folgt z.B. aus Studien an eineiigen Zwillingen, die in toxikologisch verschieden zu bewertenden Umwelten aufwuchsen (173,174). Auch die in der EINLEITUNG (S. 9) bereits erwähnten, genetisch bedingten Unterschiede im Metabolismus von Debrisoquin (36,37) und der genetischen Ausstattung mit einer bestimmten, Debrisoquin-metabolisierenden P-450 - Isoform (175) gehören hierher. Kouri et al. (176) gelang es in einer klinischen Studie, eine Korrelation zwischen der Häufigkeit von Lungenkrebs bei starken Rauchern und der Aktivität der pulmonalen AHH herzustellen. Dies entspricht den auf S. 10 (41,42) zitierten älteren Befunden an Mäusen.

Levine et al. (177) dagegen konnten zwischen der AHH-Induzierbarkeit kultivierter Lymphozytenund dem Risiko von Angehörigen der Spenderfamilien, während der Kindheit an Krebs oder Leukämie zu erkranken, keinen auf genetische Komponente(n) zurückführbaren Zusammenhang herstellen. Hierfür werden in (177) mehrere plausible Gründe genannt, die einen solchen Zusammenhang jedoch nicht prinzipiell ausschließen.

Eindrucksvolle neuere Beispiele aus Tierversuchen belegen den Zusammenhang zwischen genetisch (regulativ) bedingter Multiplizität des "Cytochrom P-450" und der Toxizität von Fremdstoffen. Kaninchenlunge z.B. ist ein gegen 4-Ipomeanol besonders empfindliches Organ. Im Gegensatz zur Kaninchenleber kommen dort zwei Isoformen vor, die diese Substanz besonders rasch in Metabolite umwandeln, die kovalent an Lungenproteine binden (178). Von ähnlich hoher Aussagekraft ist ein Befund an Forellen: Eine gegenüber dem Karzinogen Aflatoxin B_1 besonders empfindliche Art besitzt als einzige in der Leber eine P-450 - Isoform, die AFB_1 besonders schnell in das vermutete ultimate Karzinogen AFB_1-Dihydroxy-2.3-Dihydrodiol umwandelt (179). Hierher gehört auch die Beobachtung, daß ACTH den "Cytochrom P-450" - abhängigen Metabolismus von DMBA in der Nebenniere induziert,nicht jedoch die Kombination von ACTH mit anderen Kohlenwasserstoffen (einschließlich Benz(a)pyren)(180).

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß zwei P-450 - Isoformen, die bisher als funktionell und strukturell invariabel gelten mußten, hinsichtlich beider Aspekte von Präparation zu Präparation variabel, also polymorph sein können. Als zugrunde liegender biochemischer Mechanismus ließ sich für die in vivo-Ebene ein genetischer Polymorphismus verantwortlich machen. Daraus folgt,daß die Diskussion um die Streubreite der genetischen Disposition einer "outbred"-Population wie der menschlichen Bevölkerung gegenüber toxischen Wirkungen von Fremdstoffen vorsichtiger als bisher geführt werden muß. Dies gilt auch für mögliche Wechselwirkungen

von Fremdstoff(metaboliten) mit dem Stoffwechsel von Steroidhormonen. Die Risiko-abschätzende Human- und Umwelttoxikologie muß zur Kenntnis nehmen, daß die entsprechenden Streubreiten, und damit auch das toxische Potential von Fremdstoffen,wesentlich größer sein dürften, als bisher aufgrund ihrer alleinigen Verknüpfung mit der elektrophoretisch definierten Multiplizität des "Cytochrom P-450" angenommen werden konnte.

V. ZUSAMMENFASSUNG.

Diese Arbeit weist anhand der im folgenden einzeln angeführten Befunde nach,daß der Grad der strukturellen Multiplizität des "Cytochrom P-450" wesentlich höher sein muß,als bisher allgemein angenommen wurde. Die elektrophoretischen P-450 - Isoformen können aus "Subformen" zusammengesetzt sein,die sich strukturell zwar nur sehr wenig,funktionell jedoch erheblich voneinander unterscheiden. Auf dieser neuen,verfeinerten Organisationsstufe des mikrosomalen "Cytochrom P-450" gelang es in dieser Arbeit zudem,die völlige Entsprechung des genetischen,strukturellen und funktionellen Aspekts seiner Multiplizität erstmals an einem einzigen Beispiel aufzuzeigen (Ziffern 1 - 11). Hieraus ergibt sich eine wichtige Schlußfolgerung für die bewertende Umwelt- und Humantoxikologie (Ziff. 12).

1. Mikrosomen aus weißen Neuseeland-Kaninchen katalysieren die Hydroxylierung von Progesteron in den Positionen 6β, 16α und 21. Die Aktivitäten variieren innerhalb verschieden breiter Bereiche. Die Variationen der 16α- und der 6β-Hydroxylierung sind eng miteinander korreliert, wogegen 6β- und 21-Hydroxylierung unabhängig voneinander variieren.

2. Die drei genannten Reaktionen werden spezifisch von zwei elektrophoretisch voneinander unterscheidbaren P-450 - Isoformen, den Formen 1 und 3b, katalysiert.

3. Die breite Schwankung der mikrosomalen 6β-Hydroxylase geht nicht auf Schwankungen des Gehalts der Mikrosomen an Form 3b zurück, wogegen die Schwankungen der 21-hydroxylierenden Aktivität mit Schwankungen ihres Gehalts an Form 1 verknüpft scheinen.

4. Form 3b ist funktionell polymorph. Sie besitzt mindestens zwei enzymkinetisch bezüglich des Substrats Progesteron unterscheidbare Zentren. Eines von ihnen (Zentrum 1) katalysiert sowohl die 6β- wie die 16α-Hydroxylierung von Progesteron mit hoher Affinität. Im anderen Zentrum (Zentrum 2) wird Progesteron vorwiegend in 16α-Position und mit bedeutend niedrigerer Affinität hydroxyliert.

5. Elektrophoretisch identische Form 3b -Präparationen aus verschiedenen Einzeltieren sind strukturell polymorph. Formen, die zur hochaffinen 6β- und 16α-Hydroxylierung von Progesteron nicht in der Lage sind,fehlt Peptid 14 im tryptischen, HPLC-aufgetrennten Proteolysat.

6. Dem strukturellen und funktionellen Polymorphismus von Form 3b liegt ein genetischer Polymorphismus zugrunde. Kaninchen des Inzuchtstamms "IIIVO/J" und eines von 24 "random bred"-Kaninchen scheinen bezüglich dieser Form homozygot zu sein. In ihnen kommt nur derjenige Strukturanteil von Form 3b zum phänotypischen Ausdruck, der Progesteron mit der hohen Km in 16α-Position hydroxyliert ($6\beta^-$-Form 3b). Die meisten "random bred"- oder NZW-Kaninchen dagegen scheinen heterozygot, weil in ihnen daneben auch noch derjenige Strukturanteil zum Ausdruck kommt, der Progesteron sowohl in 6β- wie in 16α-Position mit der niedrigen Km hydroxyliert ($6\beta^+$-Form 3b).

7) Die beiden Form 3b-Varianten unterscheiden sich nicht hinsichtlich der Umsetzung einer Reihe exogener Substrate.

8) Neben den (dem) katalytischen Zentren (Zentrum) besitzen beide Form 3b - Varianten noch ein allosterisches Zentrum 3. Eine Reihe Ring A - reduzierter physiologischer Progesteron-Metabolite aktivieren über dieses Zentrum spezifisch die niederaffine Progesteron 16α-Hydroxylierung, wogegen einige andere die hochaffine 6β/16α-Hydroxylierung inhibieren bzw. unbeeinflußt lassen.

9) Zentrum 3 wurde auch durch direkten chemischen Einbau eines Aktivator-Analogen und daraus resultierende permanente Aktivierung von $6\beta^-$-Form 3b nachgewiesen.

10) Funktionelle, strukturelle und genetische Befunde lassen sich in einem Modell für die elektrophoretische Form 3b zusammenfassen, in dem sie sich aus mindestens zwei weitgehend identischen Polypeptidketten zusammensetzt. Der Übergang von der $6\beta^+$- zur $6\beta^-$-Form 3b läßt sich darin als Punktmutation im hochaffinen Zentrum von $6\beta^+$-Form 3b darstellen.

11) Im Gesamtergebnis zeigt die Arbeit, daß die Multiplizität des mikrosomalen "Cytochrom P-450" wesentlich größer ist als bisher aufgrund der elektrophoretischen Darstellbarkeit seiner Isoformen vermutet werden konnte. Minimale strukturelle Unterschiede können offenbar funktionelle Unterschiede zur Folge haben, die weit über das hinausgehen, was an funktionellen Unterschieden zwischen elektrophoretisch unterscheidbaren P-450 - Isoformen bisher bekannt war.

12) Durch die Aufzeigung der Multiplizität bisher als zumindest funktionell invariabel angesehener P-450 - Isoformen in dieser Arbeit muß die Diskussion um die intraspezifische Streubreite der Empfindlichkeit einer 'butbred"-Population gegenüber toxischen Wirkungen von Fremdstoffen innerhalb der Risiko-abschätzenden Human- und Umwelttoxikologie neu geführt werden. Die Streubreite dieser Empfindlichkeit, z.B. innerhalb der menschlichen Population, dürfte wesentlich größer sein, als bisher aufgrund ihrer ausschließlichen Verknüpfung mit der elektrophoretisch definierten Multiplizität des "Cytochrom P-450" angenommen werden konnte.

VI. LITERATURANGABEN und Anmerkungen.

1. Ryan, K.J., and Engel, L.L. (1957): J. Biol. Chem. 255, 103.
2. Klingelberg, M. (1958): Arch. Biochem. Biophys. 75, 376.
3. Garfinkel, D. (1958): Arch. Biochem. Biophys. 77, 493.
4. Omura, T., and Sato, R. (1964): J. Biol. Chem. 239, 2370.
5. Maines, M.D., and Anders, M.W. (1973): Arch. Biochem. Biophys. 254, 5635.
6. Wickramasinhe, R.H., and Villee, C.A. (1975): Nature 256, 509.
7. Estabrook, R.W., Cooper, D.Y., and Rosenthal, O. (1963): Biochem. Z. 338, 741.
8. Omura, T., Sato, R., Cooper, D.Y., Rosenthal, O., and Estabrook, R.W. (1965): Fed. Proc. 24, 1181.
9. Cooper, D.Y., Levin, S., Narashimhulu, S., Rosenthal, O., and Estabrook, R.W. (1965): Science 147, 400.
10. Omura, T., and Sato, R. (1962): J. Biol. Chem. 237, PC1375.
11. Lu, A.Y.H., and Coon, M.J. (1968): J. Biol. Chem. 243, 1331.
12. Lu, A.Y.H., Junk, K.W., and Coon, M.J. (1969): J. Biol. Chem. 244, 3714.
13. Strobel, H.W., Lu, A.Y.H., Heidema, J., and Coon, M.J. (1970): J. Biol. Chem. 245, 4851.
14. Haugen, D.A., van der Hoeven, T.A., and Coon, M.J. (1975): J. Biol. Chem. 250, 3567.
15. Lu, A.Y.H., Strobel, H.W., and Coon, M.J. (1970): Mol. Pharmacol. 6, 213.
16. Nebert, D.W., Heidema, J.K., Strobel, H.W., and Coon, M.J. (1973): J. Biol. Chem. 248, 7631.
17. Kaschnitz, R.M., and Coon, M.J. (1975): Biochem. Pharmacol. 24, 295.
18. Axelrod, J. (1956): J. Pharmacol. Exp. Ther. 117, 322.
19. Conney, A.H., Gillette, J.R., Inscoe, J.K., Trams, E.R., and Posner, H.S. (1959): Science 130, 1478.
20. Ingelmann-Sundberg, M., Johansson, I., and Hanssen, A. (1979): Acta Biol. Med. Germ. 38, 379.

20a. Zbaida, S., Wrighton, S.A., and Turner, C.R. (1980): Fed. Proc. 39, No. 2360.

20b. Stier, A., Finch, S.A.E., Greinert, R., Höhne, M., and Müller, R., in "Liver and Aging" (Kitani, K., ed.), S. 3-14. Elsevier Biomedical Press, 1982.

21. Lu,A.Y.H.,and West,S.B. (1980): Pharmacol.Rev. 31,277.

22. Nebert, D.W. (1979): Mol. Cell.Biochem. 27,27.

23. Nebert, D.W., and Negishi, M. (1982): Biochem. Pharmacol. 31, 2311.

24. Burke, D.M. (1981): Biochem. Pharmacol. 30, 181.

25. Nebert, D.W., Eisen, H.J., Negishi, M., Lang, M.A., Hjelmeland, L.M., and Okey, A.B. (1981): Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 21, 431.

26. Kumaki, K., and Nebert, D.W. (1978): Pharmacol. 17, 262.

27. Backes, W.L., Sligar, S.G., and Schenkmann, J.B.(1982): Biochemistry 21,1234.

28. Testa, B., and Jenner,P. (1981): Drug. Metab. Rev. 12, 1.

29. White, R.E., and Coon, M.J. (1980): Ann. Rev. Biochem. 49, 315.

30. Johnson, E.F., Levitt,D.S., Muller-Eberhard, U., and Thorgeirsson, S.S. (1980): Cancer Res. 40, 4456.

31. Colby, H.D. (1980): Adv. Sex Hormone Res. 4, 27.

32. Vesell, E.S. (1977): Clin. Pharmacol. Therap. 22, 659.

33. New. M.I., and Levine, L.S., in "Advances in Human Genetics" (Harris, H., Hirschhorn, K.K., eds.), S. 251, Plenum Press , New York, 1973.

34. New. M.I., Dupont, B., Pang. S., Pollack, M.S., and Levine, L.S. (1981):Recent Progr. Horm. Res. 37, 105.

35. Träger, L. : "Steroidhormone - Biosynthese, Stoffwechsel, Wirkung" Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, 1977.

36. Evans, D.A.P., Mahgoub, A., Sloan, T.P., Idle, J.R., and Smith, R.L. (1980): J. Med. Genet. 17, 102.

37. Ritchie, J.C., Sloan, T.P., Idle, J.R., and Smith, R.L. (1980): Ciba Found, Symp. 1979, S. 219. Copyright Excerpta Medica 1980.

38. Shefer, S., Hauser, S., and Mosbach, E.H. (1972): J. Lipid Res. 13, 69.

39. Rapp, J.P., and Dahl, L.K. (1976): Biochemistry 15,1235

40. Nebert, D.W., Shum, S., Boobis, A.R., and Atlas, S.A. (1979): Acta Biol. Med. Germ. 38, 519.

41. Legraverend, C., Mansour, B., Nebert, D.W., and Holland, J.M. (1980): Pharmacology (Basel) 20, 242.

42. Nebert, D.W. (1981): Environ. Health Perspect. 39, 11.

43. Wood, A.W., and Conney, A.H. (1974): Science 185,612.

44. Wood, A.W., and Taylor,B.A. (1979): J. Biol. Chem. 254, 5641.

45. Wood, A.W., and Taylor, B.A. (1979): J.Biol. Chem. 254,5647.

46. Kratz, F., and Staudinger, H.J. (1967): Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie 348, 568.

47. Fagan, Y.B., Pastewka, J.V., Park, S.S., Guengerich, F.P., and Gelboin, H.S. (1982): Biochemistry 21, 6574.

48. Conney, A.H. (1967): Pharmacol. Rev. 19, 317.

49. Kato, R. (1974): Drug Metab. Rev. 3, 1.

50. Skett, P., and Gustafsson, J.A. (1979): Rev. Biochem.Toxicol.1, 27.

51. Schnell, R.C., Pence, D.H., Prosser, T.D., and Miya, T.S. (1976): Toxicology 6, 277.

52. Stebbins, G.G., and Schnell, R.C. (1980): Toxicol. Appl. Pharmacol. 56, 274.

53. Lui, E.M.K., and Lucier, G.W. (1980): J. Pharmacol. Exp. Ther. 212, 211.

54. Aranda, J.V., and Renton, K.W. (1975): Can. J. Physiol. 53, 873.

55. Leakey, E.A., and Fouts, J.R. (1979): Biochem. J. 182, 233.

56. Benford, D.J., Bridges, J.W., and Parke, D.V. (1980): Xenobiotica 10, 329.

57. Kremers, P., Goujau, F., DeGraeve, J., Van Cantfort, J., and Gielen, J.E. (1981): Eur. J. Biochem. 116, 67.

58. Fry, J.R., and Wilson, C.G. (1983): J. Pharm. Pharmacol. 35, 52.

59. Neims, A.H., Warner, M., Loughnan, P.M., and Arenda, J.V. (1976): Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 16, 427.

60. Danielsson, H., and Sjovall, J. (1975): Ann. Rev. Biochem. 44, 233.

61. Boström, H., Hansson, R., Jönsson, K.H., and Wikvall, K. (1981): Eur. J. Biochem. 120, 29.

62. Anders M.W. (1971): Ann. Rev. Pharmacol. 11, 37.

63. Cinti,D.L. (1978): Pharmacol.Ther. Part A (Chemother. Toxicol. Metab. Inhibitors) 2, 727.

64. Nebert,D.W., and Jensen,N.M. (1979): Crit. Rev. Biochem. 6,401.

65. Whitlock, J.P.,jr.,and Gelboin, H.V. (1979): Pharmacol.Therap. 4,587.

66. Baxter, J.D., and Rousseau, G.G., in "Glucocorticoid Hormone Action" (Baxter, J.D., and Rousseau, G.G., eds.) S. 1 ff., Springer-Verlag New York, 1979.

67. Gillette, J.R., Davis, D.C., and Sasame, H.A. (1972): Ann. Rev. Pharmacol. 12, 57.

68. Rees, D.E. (1979): Gen. Pharmacol. 10, 341.

69. Johnson, E.F., and Muller-Eberhard, U. (1977): Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 652.

70. Guengerich, F.P., Wang, P., and Davidson, N.K. (1982): Biochemistry 21, 1698.

71. Norman, R.L., Johnson, E.F., and Muller-Eberhard, U. (1978): J. Biol. Chem. 253, 8640.

72. Liem, H., Muller-Eberhard, U., and Johnson, E.F. (1980): Mol. Pharmacol. 18, 565.

73. Johnson, E.F., and Muller-Eberhard, U. (1977): Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 644.

74. Johnson, E.F., Schwab, G.E., and Muller-Eberhard, U. (1979): Mol. Pharmacol. 15, 708.

75. Johnson, E.F. (1983): Persönliche Mitteilung.

76. Wolf, C.R., Szutowski, M.M., and Philpot, R.M. (1978): Chem. Biol. Interact. 21, 29.

77. Slaughter, S.R., Wolf, C.R., Marciniszyn, J.P., and Philpot, R.M. (1981): J. Biol. Chem. 256, 2499.

78. Koop, D.R., Morgan, E.T., Tarr, G.E., and Coon, M.J. (1982): J. Biol. Chem. 257, 8472.

79. Koop, D.R., Persson, A.V., and Coon, M.J. (1981): J. Biol. Chem. 256, 10704.

80. Miki, N., Sugiyama, T., and Yamano, T.J. (1980): J. Biochem.(Tokyo) 88,307.

81. Johnson, E.F. (1980): J. Biol. Chem. 255, 304.

82. Bonfils,C., Dalet-Beluche, I., and Maurel,P. (1982): Biochem.Biophys.Res. Commun. 104,1011.

83. Schreiben von mir an P. Maurel, Montpellier, vom 16.5.83 (vgl. S.140 ff.). Die induzierte Form wurde inzwischen immunologisch als Form 3c identifiziert (Lange, R., Bonfils, C., Larroque, C., and Maurel, P. (1984): 6th Intern.Symp. Micr. Drug Oxid.(Brighton,England,5-10 August), Abstract No. P.2/28.)

84. Conney, A.H., and Kuntzmann, R. , in " Handbook of Experimental Pharmacology (Brodie, B.B., and Gillette, J.R., eds.), vol. 28, part 2, S. 401, Springer Verlag,Berlin, 1971.

85. Chatterton, R.T.,jr.,Chatterton, A.J., and Hellman, L. (1970): Endocrin. 87, 941.

86. Lange, G., and Thun , K.J. (1970): NS - Arch. Pharmacol. 267, 265.

87. Dey, A.C., and Senciall, I.R. (1977): Can. J. Biochem. 55, 602.

88. Hall, P.E., and Fotherby, K. (1967): Biochem. J. 104, 23 P.

89. Tan, L., Rao, A.J., and Yu, P.H. (1982): J. Steroid Biochem. 17, 89.

90. Dorfman, R.I., and Unger, F. : "Metabolism of Steroid Hormones",S.289 ff., Academic Press,New York,1965.

91. Naftolin, F., and Ryan, K.J. (1975): J. Steroid. Biochem. 6, 993.

92. Hoffman, A.R., Paul, S.M., and Axelrod, J. (1980): Biochem. Pharmacol. 29, 83.

93. Fishman, J., Norton, B.I., and Hahn E.F (1980): Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 77,2374.

94. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951): J. Biol. Chem. 193, 265.

95. Bensadoun, A., and Weinstein, D. (1976): Anal. Biochem. 70, 241.

96. Handbook of Biochemistry. Selected Data for Molecular Biology (Sober, H.A. ed.), 2nd edition. Published by Chemical Rubber Co.,Cleveland,Ohio.

97. Segel, I.H.:"EnzymeKinetics" John Wiley and Sons, New York/Chichester/ Brisbane/Toronto, 1974.

98. Bischoff, F., and Bilhorn, H.R. (1948): J. Biol. Chem. 174, 663.

99. Menard, R.H., Martin, H.F., Stripp, B., Gillette, J.R., and Bartter, F.C. (1974): Life Sci.15, 1639.

100. Paul, S.M., and Axelrod, J. (1977): Life Sci.21,493.

101. Nash, T. (1953): Biochem. J. 55, 416.

102. Nebert, D.W., and Gelboin, H. (1968): J. Biol. Chem. 243. 6242.

103. Creaven, P.J., Parke, D.V., and Williams, R.T. (1965): Biochem. J. 96, 879.

104. Burke, D.M., and Mayer, R.T. (1974): Drug Metab. Disp. 2, 583.

105. Laemmli, U.K. (1970): Nature 227, 680.

106. Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., and Laemmli, U.K. (1977): J. Biol. Chem. 252, 1102.

107. Johnson, E.F., Zounes, M.C., and Muller-Eberhard, U. (1979): Arch. Biochem. Biophys. 282, 289.

108. Ozols, J., Heinemann, F.S., and Johnson, E.F. (1981): J. Biol. Chem. 256, 11405.

109. Cole, W., and Julian, P.L. (1954): J. Org. Chem. 19, 131.

110. Sweet, F., Arias, F., and Warren, J.C. (1972): J. Biol. Chem. 247, 3424.

111. "Organikum",S.467,VEB Verlag Deutscher Wissenschaften,Berlin,1968.

112. Winkel, C.A., Milewich, L., Parker, C.R., Gant, N.F., Simpson, E.R., and McDonald , P.C. (1980): J. Clin. Invest. 66, 803.

113. Van der Hoeven, T.A., and Coon, M.J. (1974): J. Biol. Chem. 249, 6302.

114. Johnson, E.F., and Muller-Eberhard, U. (1977): J. Biol. Chem. 252, 2839.

115. Albertson, P., in "Meth. Biochem. Analysis" (Glick, D., ed.), Vol. 10, S. 229 ff, Interscience Publishers, Division of John Wiley and Sons, New York ,1965.

116. Kominami, S., Ochi, H., Kobayashi, Y., and Takemori,S. (1980): J. Biol. Chem. 255, 3386.

117. Hiwatashi, A., and Ishikawa, Y. (1981): Biochem. Biophys. Acta 664, 33.

118. Bush, I.E. (1953): J. Endocrin. 9, 95.

119. Koop, D.R., and Coon, M.J. (1979): Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 1075.

120. Deutsch, J., Leutz, J.C., Yang, S.K., Gelboin, H.V., Chiang, Y.L., Vatsis, K.P., and Coon, M.J. (1978): Proc. Nat.Acad. Sci.U.S.A. 75,3123.

121. Ingelman-Sundberg, M., and Johansson, I. (1980): Biochemistry 19, 4004.

122. Oesch, F., in "Biochemical Basis of Chemical Carcinogenesis" (Greim, H., Jung, R., Kramer, M., Marquardt, H., and Oesch, F.,eds.), S. 2. Raven Press, New York, 1984.

123. Huang, M.T., Johnson, E.F., Muller-Eberhard, U., Koop, D.R., Coon, M.J., and Conney,A.H. (1981): J.Biol. Chem. 256,10897.

124. Heinemann, S., and Ozols, J. (1983): J. Biol. Chem. 258, 4195.

125. Sagami, I., and Watanabe, M. (1983): J. Biochem. 93, 1499.

126. Senciall, R., Dey, A.C., and Rahal, S. (1981): J. Steroid Biochem. 14, 281.

127. Pyerin, W., Taniguchi, H., Stier, A., Oesch, F., and Wolf, C.R. (1984): 6th Intern, Symp. Micros. Drug Oxid. (Brighton, England, 1984), Abstract No. P. 2/50.

128. Theron, C.N., Neethling, A.C., and Taljaard, J.J.F. (1983): J. Steroid Biochem. 19, 1185.

129. Parker, C.R., jr., Carr, B.R., Casey, M.L., Gant, N.F., and McDonald, P.C. (1983): Amer. J. Obstet. Gynecol. 147, 415.

130. Lax, E.R., Baumann, P., and Schriefers, H. (1983): Exp. Clin. Endocrinol. 82, 145.

131. Munabi, A.K., Cassorla, F.G., Pfeiffer, D.G., Albertson, B.D., and Loriaux, D.L. (1983): Steroids 41, 95.

132. Harada, N., and Negishi, M. (1984) J. Biol. Chem. 259, 1265.

133. Harada, N., and Negishi, M. (1984): 6th Intern. Symp. Micros. Drug Oxid. (Brighton, England, 5 - 10 August 1984), Abstract No. P. 1/59.

134. Pritchard, J.A., and McDonald, P.C. in "Williams Obstetrics",S.665 ff., Appleton-Century-Crofts, New York, 1980.

135. Winkel, C.A., Simpson, E.R., Milewich, L., and McDonald. P.C. (1980): Proc. Nat.Acad.Sci. U.S.A. 77,7069.

136. Parker, C.R., Everett R.B., Whalley, P.J., Quirk, J.G., jr. , Gant, N.F., and McDonald, P. C. (1980): Am. J. Obstet. Gynecol. 138, 626.

137. Martin, K.O., and Monder, C. (1976): Biochemistry 15, 576.

138. Senciall , R., Bullock, G., and Rehal. S. (1983): Can. J. Biol. 61,722.

139. Winkel, C.A., Wade, C.E., Danley, D.L., McDonald, P.C., and Casey, M.L. (1983): J. Steroid Biochem. 19, 1635.

140. Monroe, J.S. (1971): J. Reticuloendothelial Soc. 9, 361.

141. Comsa, J. (1959): Nature 184, 279.

142. Comsa, J., Leonhardt, H., and Ozmuski, K. (1979): Thymus 1, 81.

143. Lasker, J.M., Huang, M.T., and Conney, A.H. (1982): Science 216, 1419.

144. Wiebel, F.J., Gelboin, H.V., Buu-Hoi, N. P. Stonk, M.G., and Burnham, W.S., in "Chemical Carcinogenesis" (T'so, O. P. , and Di Paolo, J.A., eds.), Part A, S. 249 ff.,Marcel Dekker, New York, 1974.

144a. Samuels, L.T.,Bussman, L.,Matsumoto, K., and Huseby, R.A. (1975): J. Steroid Biochem. 6, 291.

144b. Nakajin, S., Shively, J.E., Yuan, P.M., and Hall, P.F. (1981): Biochemistry 20, 4037.

145. Haugen, D.A., Armes, L.G., Yasunobu, K.T., and Coon, M.J. (1977): Biochem. Biophys. Res. Commun, 77, 967.

146. Coon, M.J., Black, S.D., Fujita, V.S., Koop, D.R., and Tarr, G. E. (1984): 6th Intern. Symp. Micros. Drug. Oxid. (Brighton, England, 5-10 August 1984), Abstract No. L.6.

147. Levin, W., Yuan, P.-M., Shiveley, J.E., Walz, F.G., Vlasuk, G.P., Thomas, P.E., Omiecinski, C.J., Bresnick, E., and Ryan, D.E., in "Cytochrom P-450 - Biochemistry, Biophysics and Environmental Implications" (Hietanen, E., Laitinen, M., and Hänninen, O., eds.), S. 127-134. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam/New York/Oxford, 1982.

148. Kumar, A., Raphael, C., and Adesnik, M. (1983): J. Biol. Chem. 258, 11280.

149. Vlasuk, G.P., Ghrayeb, Y., Ryan, D.E., Reik, L., Thomas, P.E., Levin, W., and Walz, F. (1982): Biochemistry 21, 789.

150. Atchison, M., and Adesnik, M. (1983): J. Biol. Chem. 258, 11285.

151. Fujii-Kuriyama, Y., Mizukami, Y., Kawajiri, K., Sagawa, K., and Muramatsu, M. (1982): Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 79, 2793.

152. Johnson, E.F., Finlayson, M. J. P., and Raucy, J.L. (1984): 6th Intern. Symp. Micros. Drug. Oxid. (Brighton, England, 5-10 August 1984), Abstract No. L.1.

153. Leighton, J.K., De Brunner-Vossbrinck, B.A., and Kemper, B. (1984): Biochemistry 23, 204.

154. Black, S.D., Fujita, V.S., Tarr, G.E., and Coon, M.J. (1984): 6th Intern. Symp. Micros. Drug. Oxid. (Brighton, England, 5-10 August 1984), Abstract No. P.2/53.

155. Levin, W., Thomas, P.E., Reik, L.M., Ryan, D.E., Haniu, M., and Shively, J.E. (1984): 6th Intern. Symp. Micros. Drug. Oxid. (Brighton, England, 5-10 August 1984), Abstract No. L.3.

156. Harris, H. : "Principles of Human Biochemical Genetics". Elsevier/North Holland Biomedical Press,New York,1979.

157. Simmons, D.L., and Kasper, Ch. B. (1983): J. Biol. Chem. 258, 9585.

158. Fox. R.R.: Handbook on Genetically Standardized Jax Rabbits. Jackson Laboratory, Bar Harbor, 1975.

159. Cooke, A.M., Rogers, A.W., Thomas, G.H. (1963): J. Endocrinol. 27, 299.

160. Sekihara, H. (1984): J. Steroid Biochem. 20, 383.

161. Vinogradova, E.I. (1977): Probl. Endokrinol. 23, 39.

162. Challiner, M., Park, B.K., Odum, J., and Orton, T.C. (1981): Biochem. Pharmacol. 30, 2131.

163. Martin, L., Pollard, J.W,and Fagg, B.(1976): J. Endocrinol. 69, 103.

164. Jacobson, M., and Kuntzman, R. (1969): Steroids 13, 327.

165. Molenaar, P. C., and Polak, R. L. (1980): J. Neurochem. 35, 1021.

166. Kappas, A., Anderson, K.E., Conney, A.H., Pantuck, E.J., Fishman, J., and Bradlow, H.L. (1983): Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 80, 7646.

167. Soyka, L.F., and Long, R.J. (1972): J. Pharmacol. Exp. Ther. 182,320.

168. Anderson, K. E., Freddara, U., and Kappas, A. (1983): Arch. Biochem. Biophys. 217. 597.

169. Wood, A., Ryan, D.E., Thomas, P.E., and Levin, W. (1983): J. Biol. Chem. 258, 8839.

170. Cheng, K.-C., and Schenkman, J.B. (1983): J. Biol. Chem. 258, 11738.

171. Ryan. D.E., Iida, Sh., Wood, A.W., Thomas, P.E., Lieber, C.S., and Levin, W. (1984): J. Biol. Chem. 259, 1239.

172. Morgan, E.T., MacGeoch, C.,and Gustafsson, J.-A. (1984): 6th Intern. Symp. Micros. Drug. Oxid. (Brighton, England, 5-10 August 1984), Abstract No. O.11.

173. Nebert, D.W., in "Enzymatic Basis of Detoxification" (Jacoby, W.B., ed.) Vol. I, S. 25 ff.,Academic Press, New York, 1980.

174. Penno, M.B., Dvorchik, B.H., and Vesell, E.S. (1981): Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 78, 5193.

175. Gut, J., Gasser, R., Dayer, P., Meier, U.T., Kronbach, T., Catin, T., and Meyer, U.A. (1984): 6th Intern. Symp. Micros. Drug. Oxid. (Brighton, England, 5-10 August 1984), Abstract No. P.4/20.

176. Kouri, R.E., McKinney, C.E., Slomiany, D.J., Snodgrass, D.R., Wray, N.P., and McLemore , T.L. (1982): Cancer Res. 42, 5030.

177. Levine, A.S., McKinney, C.E., Echelberger, C.K., Kouri, R.E., Edwards, B. K., and Nebert, D.W. (1984): Cancer Res. 44,358.

178. Wolf, C.R., Statham, Ch.N., McMenamin, M.G., Bend, J.R., Boyd, M.R., and Philpot, R.M. (1982): Mol. Pharmacol. 22, 738.

179. Williams, D.E., and Buhler, D.R. (1983): Cancer Res. 43, 4572.

180. Hallberg, E., Montelius, J., and Rydström,J. (1983): Biochem. Pharmacol. 32, 709.

181. Waskell, L., Canova-Davis, E., and Philpot, R.M. (1984): 6th Intern. Symp.Micr.Drug Oxid. (Brighton,England, 5-10 August 1984),Abstract No. P.2/13.

182. Reubi, I.,Griffin, K.J.,Raucy, J.L.,and Johnson,E.F. (1984): J. Biol. Chem. 259,5887.

183. Schwab, G.E., and Johnson, E.F. (1984): Arch.Biochem.Biophys. (in press).

184. Johnson, E.F., and Griffin, K.J. (1984): Arch.Biochem.Biophys. (in press).

185. Johnson, E.F.,Finlayson, M.J.P.,Tukey, R.H., and Raucy, J.L. (1984),in: "Proceedings of the 6th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidation",Brighton,England,5-10 august 1984 (in press).

186. Muller-Eberhard, U.,Ghizzoni, L.,Liem, H.H.,New, M.,Finlayson, M., and Johnson, E.F. (1984): Ann.NY Acad. Sci. (submitted).

187. Reubi, I.,Griffin, K.J.,Raucy, J.,and Johnson, E.F.(1984): Biochemistry 23,4598.

Teile der hier vorgelegten Arbeit sind unter folgenden Zitaten veröffentlicht worden:

188. Dieter, H.H., Muller-Eberhard, U., and Johnson, E.F. (1982): Science 317, 741.

189. Dieter, H.H.,Muller-Eberhard, U., and Johnson, E.F. (1982): Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 515.

190. Dieter, H.H., and Johnson, E.F. (1982): J. Biol. Chem. 257,9315.

191. Johnson, E.F., Dieter, H.H., and Muller-Eberhard, U. (1982),in: "Microsomes,Drug Oxidations and Drug Toxicities" (Sato, R.,et al.,eds.), Japan Scientific Press,pp. 35-43.

192. Johnson, E.F.,Dieter, H.H.,Schwab, G.E.,Reubi, I., and Muller-Eberhard,U. (1982),in: "Cytochrom P-450,Biochemistry,Biophysics and Environmental Implications" (Hietanen, E.,et al.,eds.),Elsevier Biomedical Press,pp.337-340.

193. Johnson, E.F.,Dieter, H.H.,Schwab, G.E., Reubi, I., and Muller-Eberhard,U. (1982),in: vgl. ref. 192,pp. 283-290.

194. Johnson, E.F.,Schwab, G.E., and Dieter, H.H. (1983): J. Biol. Chem. 258, 2785.

Erwähnt sei auch der folgende Übersichtsartikel:

195. Johnson, E.F., and Schwab, G.E. (1984): Xenobiotica 14, 3.

VII. DANKSAGUNG.

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1980 - 1984 an der "Scripps Clinic and Research Foundation,Department of Biochemistry",La Jolla,USA, sowie am Institut für Toxikologie der Universität Düsseldorf durchgeführt.

An erster Stelle habe ich Herrn Prof. Dr. F.K. Ohnesorge zu danken. Als mein Chef und Lehrer trug er durch kritisch-aufbauende Fragen und wichtige Anregungen aus toxikologischer Sicht wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ebenso gebührt mein Dank Frau U. Muller-Eberhard M.D. ,USA. Sie begleitete diese Untersuchungen mit engagiertem,anspornendem Interesse und stellte als Leiterin des Labors in La Jolla einen wesentlichen Anteil der benötigten Sach- und Personalmittel zur Verfügung.

Meine besondere Verpflichtung gilt E.F. Johnson Ph.D.,La Jolla,USA. Ihm habe ich für die bereitwillige Integration des Themas in den Arbeitsschwerpunkt seines Teams,sowie zahllose fachliche,methodische und wissenschaftstheoretische Erörterungen zu danken,die das Gesamtbild dieser Arbeit wesentlich mitgeprägt haben. Die Bereitstellung der elektrophoretischen P-450 - Isoformen,in deren Reindarstellung er mich einwies,sowie der monoclonalen Antikörper IF-11 und MCA-A war außerdem eine wesentliche Hilfe für die Durchführung meiner Untersuchungen.

Herrn G. Schwab danke ich für die überaus sorgfältige und mitverantwortlich geleistete Hilfe bei zahlreichen Aktivitätsbestimmungen und Analysen,sowie die unermüdliche Bereitstellung gereinigter Cytochrom P-450 - Reduktase. Seiner und der Anregung von E.F. Johnson entstammt außerdem die Einbeziehung der 2-Hydroxylierung von Östradiol in die Untersuchungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Gewährung eines einjährigen Forschungsstipendiums (1980) sowie eines dreimonatigen Reisestipendiums (1983),und der Universität Düsseldorf für die Genehmigung des 1980/81 (18 Monate) und 1983 (3 Monate) benötigten Sonderurlaubs,von dem 9 Monate (6 in 1981 und 3 in 1983) aus Planstellen-Mitteln finanziert wurden.

VIII. ANHANG

1. Schreiben des Autors an P.Maurel,Montpellier,zur Frage der Identität von "TAO-Form 3b"[1].

A

DR.PATRICK MAUREL
INSERM U 128

ROUTE DE MENDE - B.P.5051
(CNRS)

34033 MONTPELLIER CEDEX

DÜSSELDORF,MAY 16,1983.

DEAR DR. MAUREL,

AT FIRST I HAVE TO EXCUSE MYSELF FOR THE LONG GAP SINCE MY LAST LETTER. I CAME BACK FROM USA AT THE END OF MARCH. I DID NOT WHRITE IMMEDIATELY, HOWEVER,BECAUSE I WANTED TO BE SURE NOT TO FORGET ANY DETAIL IN INTERPRETING MY RESULTS WITH YOUR FORM 3B(TAO) AND THE MICROSOMES.

EXPERIMENTS TO THE FOLLOWING QUESTIONS HAVE BEEN PERFORMED IN LA JOLLA (LJ):

1) IS FORM 3B(TAO) IDENTICAL WITH FORM 3B(LJ) ?

METHOD: INHIBITION OF PROGESTERONE-HYDROXYLATION (6β AND 16α) AS CATALYZED BY FORM 3B(TAO) BY A MONOCLONAL ANTIBODY (MCA-A) WHICH WAS RAISED AGAINST FORM 3B(LJ) IN JOHNSONS LABORATORY.

RESULT: SEE TABLE 1 (ENCLOSED).[2]

CONCLUSION: FORM 3B(TAO) IS RECOGNIZED AS ANTIGEN BY MCA-A. BOTH FORM 3B(TAO) AND FORM 3B(LJ) POSSESS THE SAME ANTIGENIC DETERMINANTS. THE CYTOCHROME YOU HAVE ISOLATED FROM TAO-TREATED RABBITS IS FORM 3B AS IDENTIFIED BY E.F.JOHNSON OR M.J.COON (YOUR EXPERIMENTS).
NOTE THAT THE DEGREE OF INHIBITION IS THE SAME AT BOTH [S]. OBVIOUSLY, THE HIGH- AS WELL AS THE LOW-AFFINITY SITE OF THE ENZYME ARE RECOGNIZED AS ANTIGENIC DETERMINANTS BY THIS MONOCLONAL ANTIBODY.

2) IF FORM 3B(LJ) IS INDUCED BY TAO IN RABBITS,DO THE CORRESPONDING TAO-MICROSOMES HAVE HIGHER PROGESTERONE-HYDROXYLATING ACTIVITIES THAN CONTROL-MICROSOMES ?

METHOD: INCUBATION OF YOUR MICROSOMES (TAO AND CONTROL) WITH PROGESTERONE AT TWO DIFFERENT [S].

RESULT: SEE TABLE 2 (ENCLOSED).[2]

CONCLUSION: IN CONTRAST TO MY INTERPRETATION FROM DECEMBER,THE CONCLUSION FROM THIS TABLE HAS TO BE THAT INDUCTION OF FORM 3B(LJ) BY TAO IS IMPROBABLE

---

[1] vgl. hierzu Anmerkungen 82 und 83 sowie Text S. 17,Zeilen 9-12.

[2] s.S.142.

(Brief an P.Maurel,Seite 2)

BECAUSE

- TAO DOES NOT CHANGE THE 16α-HYDROXYLATING ACTIVITY ON A P-450 - BASIS,AND
- THE 6β-HYDROXYLATING ACTIVITY BEING INDUCED DOES NOT SEEM TO BE A HIGH-AFFINITY - ACTIVITY AS IT IS TYPICAL FOR FORM 3B-6β$^+$ (SEE MINE'S AND JOHNSON'S JBC-PAPER FROM AUGUST 1982),OTHERWISE THE INCREASE IN ACTIVITY BY GOING FROM THE LOW TO THE HIGH [S] SHOULD NOT BE ABOUT THE SAME FOR BOTH KINDS OF MICROSOMES.

THE INTERPRETATION FROM DECEMBER MAY NOT BE WRONG,BUT IT IS LESS LIKELY. IT WOULD REQUIRE,THAT THE INDUCED FORM 3B IS A 6β$^-$ - FORM,BUT WITH A VERY HIGH LOW - AFFINITY V_{MAX}. TABLE 1 ACTUALLY SHOWS THAT FORM 3B(TAO) IS CHARACTERIZED BY A HIGH - AFFINITY 6β-SITE (0.420VS. 0.513 mU/NMOL P-450 AT 8.5 AND 25.5 µM SUBSTRATE,RESPECTIVELY).

TABLE 2 RATHER SHOWS THAT TAO IS INDUCING ONE OR MORE P-450 - FORMS WHICH ARE CHARACTERIZED BY A LOW - AFFINITY 6β-SITE,BUT NEITHER FORM 3B(LJ) NOR FORM 3B(TAO).

3) IF FORM 3B(LJ OR TAO) IS INDUCED BY TAO IN RABBITS,DOES THE MONOCLONAL ANTIBODY MCA-A INHIBIT THE PROGESTERONE-HYDROXYLATION IN PRESENCE OF TAO- OR CONTROL-MICROSOMES DIFFERENTIALLY ?

METHOD: INCUBATION OF YOUR TWO MICROSOMAL PREPARATIONS (TAO AND CONTROL) WITH MCA-A AND DETERMINATION OF PROGESTERONE-TURNOVER AT HIGH AND LOW [S].

RESULT: SEE TABLE 3 (ENCLOSED).[1)]

CONCLUSION: AS STATED ALREADY UNDER 2),TAO INDUCES SOME PROGESTERONE--6β-HYDROXYLATION,BUT NOT DUE TO INDUCTION OF FORM 3B(TAO OR LJ),BECAUSE

- MCA-A INHIBITS THE MICROSOMAL 16α-HYDROXYLASE IN TAO-MICROSOMES TO A MUCH LESSER EXTENT THAN IN CONTROL MICROSOMES,AND
- MCA-A DOES ALMOST NOT INHIBIT THE MICROSOMAL 6β-HYDROXYLATING ACTIVITY IN TAO-MICROSOMES,WHEREAS IN CONTROL-MICROSOMES THE INHIBITION IS VERY EFFECTIVE. THE INHIBITED FRACTION OF THE ACTIVITY AT HIGH [S] IS COMPLETELY COMPENSATED FOR BY A 6β-HYDROXYLATING ACTIVITY OF UNKNOWN IDENTITY.

4) DOES SDS-PAGE SHOW INDUCTION OF FORM 3B(TAO OR LJ) ?

METHOD: SDS-PAGE COMPARING YOUR MICROSOMAL PREP'S WITH PREPARATIONS FROM E.F.JOHNSON'S LABORATORY.

RESULT: SEE ENCLOSED COPY AF A LETTER FROM E.F.JOHNSON TO ME.

CONCLUSION: SEE THAT LETTER ALSO.

(Dieser Brief bestätigte meine Vermutung,daß Form 3b(TAO oder LJ) durch TAO nicht induziert wird)

5) IF FORM 3B(TAO OR LJ) IS INDUCED BY TAO IN RABBITS,DOES MCA-A IN A BINDING EXPERIMENT RECOGNIZE MORE FORM 3B(TAO OR LJ) IN TAO-MICROSOMES THAN IN CONTROL-MICROSOMES ?

METHOD: IMMUNOQUANTIFICATION OF FORM 3B(TAO) IN YOUR MICROSOMES (TAO AND CONTROL) AND OF FORM 3B(LJ) IN MICROSOMES OF DIFFERENT ORIGINS FROM E.F.JOHNSON'S LABORATORY.

RESULT: THE DIFFERENCESIN FORM 3B(TAO) - CONTENT FOUND BY THIS WAY BETWEEN YOUR TAO- AND YOUR CONTROL-MICROSOMES WERE NOT GREATER THAN BETWEEN ANY CONTROL MICROSOMES FROM RANDOM BRED NZW-RABBITS WITH RESPECT TO FORM 3B(LJ) FROM JOHNSON'S LABORATORY. THIS MEANS THAT INDUCTION OF

1)s.S.143.

FORM 3B(TAO OR LJ) MAY OR MAY NOT HAVE TAKEN PLACE. Nachträgliche Anmerkung: Bei der isolierten "TAO-Form 3b" handeltees sich also wahrscheinlich um 6β+-Form 3b - ob diese jedoch durch TAO induziert worden ist,erscheint zumindest fraglich.

FINAL CONCLUSIONS: SOME TECHNIQUES,ESP. ENZYMATIC ACTIVITIES TW.PROGESTERONE AND THEIR INHIBITION BY A MONOCLONAL ANTIBODY SHOW THAT FORM 3B(TAO OR LJ) IS NOT INDUCED IN RABBITS OR THAT FORM 3B(TAO) IS NOT IDENTICAL WITH FORM 3B(LJ). THIS LATTER ASSUMPTION WOULD BE DIFFICULT TO UNDERSTAND,BECAUSE FORM 3B(LJ) AS WELL AS YOUR FORM 3B(TAO) IS IDENTICAL WITH M.J.COON'S FORM 3B UNDER MANY RESPECTS. NOTE,HOWEVER,THAT THE RESULTS FROM THE IMMUNOQUANTIFICATION AND FROM SDS-PAGE MAY NOT BE THE LAST WORD YET.

(...) PLEASE ASK ME ANY OPEN QUESTION CONCERNING THE ACTIVITY DETERMINATIONS. AS TO THE IMMUNOLOGIC DETERMINATIONS YOU SHOULD WHRITE DIRECTLY TO E.F.JOHNSON.

SINCERLY YOURS, (DR.HERMANN H.DIETER).

TABLE 1:

SAMPLE NO.	S [µM]	ANTIBODY[1]	16α-HYDROXYLATION		6β-HYDROXYLATION	
			mU/nMOL P-450	%	mU/nMOL P-450	%
1	8.5	----	0.643	100	0.420	100
2		IF-11	0.583	91	0.370	88
3		MCA-A	0.143	22	0.113	27
4	25.5	----	1.14	100	0.513	100
5		IF-11	1.014	89	0.460	89.6
6		MCA-A	0.251	22	0.460	32.5

[1] MONOCLONAL ANTIBODies AGAINST FORM 1 (IF-11) und Form 3b(MCA-A) FROM E.F.JOHNSON'S LAB.

TEST CONDITIONS: SEE J.BIOL.CHEM.257,9315 (1982). THE ANTIBODIES WERE ADDED TO THE INCUBATION MIXTURE BEFORE THE SUBSTRATE IN A CONCENTRATION OF 50 µG/ML AN PREINCUBATED WITH THE ENZYME IN ABSENCE OF SUBSTRATE FOR 60 MINUTES AT 4°C.

TABLE 2:

SAMPLE NO. (DUPLICATES)	MICROSOMES	S [µM]	16α-HYDROXYLATION		6β-HYDROXYLATION		21-HYDROXYLATION	
			mU/MG	mU/nMOL	mU/MG	mU/nMOL	mU/MG	mU/nMOL
1	TAO	7.5	0.384	0.160	1.73	0.721	0.240	0.100
2	CONTR.	7.5	0.475	0.297	0.747	0.467	0.992[1]	0.620
3	TAO	1.6	0.125	0.052	0.355	0.148	0.108	0.045
4	CONTR.	1.6	0.134	0.084	0.211	0.132	0.554	0.346

[1] THESE ARE "HIG 21"-MICROSOMES AS CHARACTERIZED IN SCIENCE 217,741-743 (1982).

TEST CONDITIONS: SEE J.BIOL.CHEM.257,9315 (1982).

(Brief an P.Maurel,Seite 4)

TABLE 3:

SAMPLE NO.	MICRO-SOMES	ANTI-BODY [1]	S [µM]	16α-HYDROXYLATION mU/ MOL	%	6β-HYDROXYLATION mU/ MOL	%	21-HYDROXYLATION mU/ MOL	%
1	CONTR.	IF-11	1.82	0.087	100	0.244	100	0.015	7.5
3	CONTR.	MCA-A	1.82	0.027	31	0.052	21	0.200	100
5	TAO	IF-11	1.82	0.045	100	0.216	100	N.D.	
7	TAO	MCA-A	1.82	0.029	64	0.189	87.5	N.D.	
2	CONTR.	IF-11	15.0	0.241	100	0.461	100	0.032	10
4	CONTR.	MCA-A	15.0	0.044	18	0.120	26	0.314	100
6	TAO	IF-11	15.0	0.128	100	0.714	100	N.D.	
8	TAO	MCA-A	15.0	0.063	48	0.736	103	N.D.	

1) SEE TABLE 1,ALSO FOR METHODS.

(Ende des Briefs an P.Maurel)

---

2. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung Nr.	Seite	Abbildung Nr.	Seite	Abbildung Nr.	Seite
1	5	17a/b	67	33	110
2	5	18	69	34	113
3	14	19	73	35	116
4	19	20	74		
5	21	21	75		
6a/b	41	22	80	Tabelle Nr.	Seite
7	42	23	84		
8	46	24	84		
9	48	25	86	1a/b	39/40
10	50	26	86	2	44
11	52	27	87	3	47
12	54	28	89	4	55
13	54	29	94	5	58
14	60	30	98	6	65
15	62	31	99	7	65
16	63	32	100	8	78
				9	82
				10	96

Druck und Verarbeitung: Dissertations Druck Darmstadt, Tel. 0 61 51 / 21 3 53